

**EL METAPNEUMOVIRUS HUMANO COMO AGENTE ETIOLÓGICO VIRAL DE
INFECCIÓN RESPIRATORIA AGUDA EN NIÑOS MENORES DE DOS AÑOS QUE
CONSULTAN UNA INSTITUCIÓN HOSPITALARIA NIVEL III EN CALI**

MELISSA PELÁEZ MORENO

Código 1402540

Universidad del Valle

Facultad de Salud

Escuela de Ciencias Básicas

Maestría en Ciencias Biomédicas

2017

**EL METAPNEUMOVIRUS HUMANO COMO AGENTE ETIOLÓGICO VIRAL DE
INFECCIÓN RESPIRATORIA AGUDA EN NIÑOS MENORES DE DOS AÑOS QUE
CONSULTAN UNA INSTITUCIÓN HOSPITALARIA NIVEL III EN CALI**

MELISSA PELÁEZ MORENO
Código 1402540

Director. BEATRIZ PARRA PATIÑO, PhD

Trabajo de grado para optar al título de Magíster en Ciencias Biomédicas

Universidad del Valle
Facultad de Salud
Escuela de Ciencias Básicas
Maestría en Ciencias Biomédicas
2017

Nota de aceptación

Firma del Presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Santiago de Cali, Diciembre 15 de 2017

Dedicatoria

A mis papás Martha y Miguel por ser mi inspiración.

A DIOS, gracias por éste proceso.

Agradecimientos

A todos los participantes en el estudio y sus familias, su aporte en el estudio fue invaluable.

Al Hospital Universitario del Valle por permitirnos realizar el estudio en sus instalaciones y al Dr. Jaime Roa por abrirnos las puertas de la sala de urgencias pediátricas y permitirnos realizar el proyecto con sus pacientes. A los residentes de pediatría por toda su colaboración y apoyo clínico.

A mi tutora Dra. Beatriz Parra por sus enseñanzas académicas y personales. Gracias por siempre impulsarme al siguiente nivel.

A la Universidad del Valle y la Escuela de Ciencias Básicas por la formación integral y su gran apoyo financiero para el desarrollo de este estudio.

Al grupo VIREM y al laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología: Graciela Rengifo, Constanza Nuñez, Liliana Soto y a Jacqueline Astudillo por su colaboración en el laboratorio durante todo el proceso.

A la Dra. Anilza Bonelo, por su orientación, acogimiento y enseñanzas.

Al Dr. Eduardo López por su apoyo desde el inicio del estudio y su asesoría clínica.

A mi familia. Gracias por su comprensión y apoyo incondicional.

Tabla de contenido

Nota de aceptación.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Tabla de contenido	vi
Índice de Figuras	viii
Índice de Tablas	ix
Lista de abreviaturas	x
Resumen	xi
1 Planteamiento del problema	12
2 Estado del arte	15
3 Marco Teórico.....	21
3.1 Las infecciones respiratorias agudas en población infantil.....	21
3.2 El Metapneumovirus humano	22
3.2.1 Clasificación virológica	22
3.2.2 Epidemiología y ciclo de infección.....	24
3.2.3 Características clínicas de la infección por HMPV y enfermedades asociadas.....	27
3.2.4 Tratamientos y desarrollo de vacunas	29
3.2.5 Métodos diagnósticos para HMPV.....	30
4 Objetivos	32
4.1 Objetivo general	32
4.2 Objetivos específicos.....	32
5 Metodología.....	33
5.1 Tipo de estudio	33
5.2 Fuentes de datos	33
5.3 Área de estudio	34
5.4 Población y muestra	34
5.5 Definición de variables.....	37
5.6 Procedimientos de laboratorio	40
5.6.1 Muestra de secreción nasofaríngea.....	40
5.6.2 Inmunofluorescencia para HMPV y demás virus respiratorios	41

5.6.3	Detección molecular del HMPV	42
5.7	Análisis y Métodos estadísticos	44
5.7.1	Frecuencia del HMPV y características clínicas en la población de estudio	44
5.7.2	Evaluación del desempeño diagnóstico de la prueba molecular	45
5.8	Consideraciones éticas.....	46
6	Resultados	48
6.1	Descripción de las características sociodemográficas y clínicas de los sujetos del estudio.....	48
6.2	Determinación de la prevalencia del HMPV	49
6.2.1	Evaluación de la positividad viral por IFA según el tipo de células del tracto respiratorio	50
6.3	Descripción las características clínicas, de severidad, desenlace clínico y ocurrencia de infecciones virales mixtas en niños menores de 2 años con IRA por HMPV	53
6.3.1	Baja frecuencia de infecciones virales mixtas.....	56
6.4	Evaluación del desempeño diagnóstico de la RT-PCR en tiempo real.....	56
6.4.1	Diagnóstico molecular de HMPV por la prueba RT-PCR en tiempo real.....	57
6.4.2	Diagnóstico molecular de RSV por la prueba RT-PCR en tiempo real.....	59
7	Discusión.....	62
8	Limitaciones.....	73
9	Conclusiones	74
10	Perspectivas	75
11	Referencias bibliográficas.....	76
12	Anexos	84
12.1	Anexo 1. Formato de reporte de caso.....	85
12.2	Anexo 2. Tabla de valores de referencia para hemograma.....	86
12.3	Anexo 4. Características de desempeño del LIGHT DIAGNOSTICS™ Respiratory Panel I Viral Screening and Identification IFA” Cat No. 3105:	86
12.4	Anexo 5. Escala de gravedad de la enfermedad.....	87
12.5	Anexo 6. Primers y programas:	88
12.6	Anexo 7. Escala de Landis y Koch de 1977 para índice kappa de Cohen.....	89
12.7	Anexo 8. Muestras discordantes entre la IFA y el RT-PCR en tiempo real para HMPV	89
12.8	Anexo 9. Muestras discordantes entre la IFA y el RT-PCR en tiempo real para RSV	90

Índice de Figuras

Gráfico 1 Estructura y genoma del metapneumovirus humano	23
Gráfico 2. Ciclo replicativo de HMPV	25
Gráfico 3. Lugar anatómico para la toma de muestra nasofaríngea	41
Gráfico 4. Inmunofluorescencia positiva y negativa (40x).	42
Gráfico 5. Células de muestras nasales y nasofaríngeas (40x).....	52

Índice de Tablas

Tabla 1. Operacionalización de las variables	38
Tabla 2. Características sociodemográficas y clínicas a la inclusión de niños con sospecha de IRA en las primeras 20 semanas epidemiológicas del 2017 (n=106)	49
Tabla 3. Frecuencia de virus respiratorios hasta semana epidemiológica 20 de 2017. 50	
Tabla 4. Frecuencia viral por IFA de acuerdo al tipo de muestra (n, %)	51
Tabla 5. Características clínicas y de laboratorio según agente etiológico, n=106	54
Tabla 6 Detección de HMPV por IFA versus RT-PCR en tiempo real (n, %)	57
Tabla 7. Comparación de valor CT del RT-PCR en tiempo real en muestras discordantes con la IFA para HMPV (n=19)	59
Tabla 8 Detección de RSV por IFA versus RT-PCR en tiempo real (n, %)	60
Tabla 9. Comparación de valor CT del RT-PCR en tiempo real en muestras discordantes con la IFA para RSV, (n=64)	60

Lista de abreviaturas

AdV	Adenovirus
BES:	Boletín Epidemiológico Semanal
CDC:	Centro de Control y Prevención de Enfermedad (Centers of Disease Control and Prevention)
cDNA:	DNA complementario
CRF:	Formato de Reporte Clínico(Clinical Format Report)
CT:	Ciclo Umbral de Detección (Threshold Cycle)
DNA:	Ácido Desoxirribonucleico
ESI:	Enfermedad Similar a Influenza
FDA:	Food & Drug Administration
FITC:	isotiocianato de Fluoresceína
FluA	Virus de la Influenza A
FluB	Virus de la Influenza B
HMPV:	Metapneumovirus humano
HUV:	Hospital Universitario del Valle
IFA:	Inmunofluorescencia
INS:	Instituto Nacional de Salud
IRA:	Infección Respiratoria Aguda
IRAG:	Infección Respiratoria Aguda Grave
LDAB:	Laboratorio de Diagnostico de Agentes Biológicos de la Universidad del Valle
mRNA:	RNA mensajero
NTC:	Control sin muestra (Non Template Control)
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PIV:	Parainfluenza virus
RNA:	Ácido Ribonucleico
RNP:	Ribonucleoproteína P
RSV:	Virus Respiratorio Sincitial
RT-PCR:	Transcripción reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa
SIVIGILA:	Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Publica
TICD50 50%:	Dosis en la que el 50% del cultivo está infectado (Tissue Infective Culture Dose)
UPGD:	Unidad Primaria Generadora de Datos
vRNA:	RNA viral

Resumen

Introducción: Las infecciones respiratorias agudas (IRA) son la primera causa infecciosa de morbilidad infantil a nivel mundial. La etiología viral es la más frecuente asociada a las IRA, el virus sincitial respiratorio (RSV) y metapneumovirus humano (HMPV) suelen ser los principales virus en las infecciones del tracto respiratorio inferior causando bronquiolitis y neumonía en niños menores de 5 años, con una mayor prevalencia de mortalidad en los menores de 1 año. En Colombia, según la OMS, las IRA ha causado 22.331 muertes infantiles desde el 2000 hasta el 2015. Tal mortandad representa el 17.5% de muertes por causas infecciosas en niños entre 1 y 59 meses, seguida por la diarrea con un 4.5% de muertes infantiles. En los últimos años se han reconocido virus no tradicionales como posibles agentes etiológicos de las IRA, uno de los más importantes es el HMPV descrito desde el 2001 en Los Países Bajos causando IRA en menores de cinco años. Recientemente no se conocen estudios sobre la frecuencia viral en las IRA de la ciudad de Cali. *Objetivo:* Determinar la prevalencia de HMPV en las IRA de niños menores de dos años que asisten a la sala de urgencias pediátricas de una institución nivel III en Cali. *Metodología:* Se evaluaron muestras de aspirado nasofaríngeo de 106 niños menores de dos años con signos y síntomas compatibles con IRA viral de la sala de urgencias pediátricas de una institución nivel III en Cali. Las muestras se recolectaron en las primeras 20 semanas epidemiológicas del año 2017. Se utilizaron estuches comerciales de inmunofluorescencia y RT-PCR en tiempo real para la detección de ocho virus respiratorios y sólo RSV y HMPV respectivamente. *Resultados:* Se estableció que el HMPV fue el agente etiológico en 16.98% (IC95%: 11.15-26.56%) de los casos. Un total de 87 muestras (82.07%) fueron positivas para algún virus. Además se confirmó que RSV fue la causa más frecuente de IRA y principal causa de bronquiolitis en los menores de 2 años evaluados. Fueron positivos para RSV 63 niños (59.43%), 4 niños (3.77%) tenían parainfluenza-3 y 2 niños (1.89%) influenza B. Ninguna muestra fue positiva para adenovirus, influenza A, parainfluenza-1 y parainfluenza-2. *Conclusiones:* El HMPV fue el segundo virus más frecuentemente encontrado luego de RSV, y los resultados indican que aproximadamente un 80% de las infecciones respiratorias virales en lactantes son causadas por RSV y HMPV. Además, se determinó que para la detección de HMPV existe una excelente concordancia en la detección molecular por RT-PCR y la prueba de inmunofluorescencia. Por el contrario, la detección molecular de RSV parece ser más sensible que por inmunofluorescencia. Este estudio describe frecuencia de la etiología viral en niños con IRA en Cali y expone la creciente necesidad de ampliar la sospecha clínica a virus no clásicos como el HMPV.

Palabras Clave: Virus respiratorios, metapneumovirus, virus sincitial respiratorio, Infección respiratoria aguda, infección del tracto respiratorio.

1 Planteamiento del problema

El Metapneumovirus humano (HMPV) es un agente etiológico viral de Infección Respiratoria Aguda (IRA) reconocido desde el 2001 a nivel mundial. En Colombia según el “Global Health Observatory data repository” de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la IRA ha causado 22.331 muertes infantiles desde el 2000 hasta el 2015^{1,2}. En nuestro país, la IRA fue responsable del 17,5% de muertes por causas infecciosas en niños entre 1 y 59 meses, seguida por diarrea con un 4.5%, lo cual la hace nuestra principal causa de muerte infecciosa infantil ¹. La IRA también es la primera causa infecciosa de muerte infantil a nivel mundial, para el 2015 fue la responsable del 13% de éstas muertes. La incidencia de estas infecciones a nivel mundial es similar pero difieren en la tasa de mortalidad asociada, siendo mayor en los países en vía de desarrollo en comparación con los países desarrollados, esto inherente a la calidad de los servicios de salud, estado nutricional de los niños, entre otros. En América Latina durante el año 2011, un 10% de las causas de muertes en niños menores de cuatro años fueron ocasionadas por infecciones respiratorias y de éstas un 26% fueron de origen viral.

Según datos de la OMS, en las Américas la incidencia de IRA severa en menores de 5 años fue de 19.8 por cada 1000 niños y en menores de 1 año fue de 46 por cada 1000 niños. En cuanto a IRA muy severa la incidencia fue de 3 por cada 1000 niños menores de 5 años y 11 por cada 1000 lactantes menores de 1 año. En esta región se registran más de 100.000 muertes anuales en niños menores de un año por procesos respiratorios. De estas muertes, el 99% se producen en los países en vía de desarrollo de América Latina y el Caribe. En Colombia, la prevalencia y mortalidad por IRA ha aumentado en los últimos 5 años. En el 2011 se notificaron 4'168.783 de casos por IRA y 470 casos fatales en menores de cinco años, sin conocer datos socio-demográficos ni etiológicos. Y para el 2015, la tasa de mortalidad infantil por IRA viral fue de 12,1 por cada 100.000 menores de 5 años.

De los virus respiratorios causantes de IRA superior e inferior, el virus sincitial

respiratorio (RSV), los parainfluenza (PIV), adenovirus (AdV), influenza A (FluA) e influenza B (FluB) son los virus más frecuentes en menores de 5 años. Estas infecciones respiratorias, además de la preocupante mortalidad en niños pequeños a riesgo, acarrearán altos costos a la sociedad ya que cursan con pérdida de días laborales de los padres y días escolares de los niños, costos al sistema de salud local y otros como asociaciones en el desarrollo de enfermedades respiratorias crónicas, por lo tanto es un área de investigación científica importante, que busca contribuir al diseño de vacunas o terapias efectivas que eviten morbilidad y mortalidad.

El Instituto Nacional de Salud (INS) es el responsable de la vigilancia epidemiológica para las IRA en todo el territorio nacional, lo cual se cumple a través de instituciones centinelas (Unidad Primaria Generadora de Datos, UPGD). En la práctica clínica la identificación del agente etiológico de una IRA viral se hace mediante inmunofluorescencia (IFA) para la detección de antígenos virales, como método de referencia. Sin embargo, las técnicas moleculares son cada vez más ampliamente utilizadas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), éstas detectan una porción específica de los ácidos nucleicos virales y han sido aceptadas en el campo diagnóstico-clínico dado que su sensibilidad es comparable e incluso mayor a los métodos de referencia y el tiempo de resultados es menor. A pesar de que éstas metodologías son altamente sensibles y específicas, un problema frecuente es una gran proporción de muestras en las que no se ha logrado identificar un agente etiológico, sugiriendo que pueden ser causadas por otros virus no incluidos en los tests.

Se han reconocido otros virus, no tradicionales, como posibles causantes de IRA, uno de ellos es el recientemente descubierto HMPV³. HMPV se encontró como agente viral causal de IRA desde el 2001 en Los Países Bajos en niños menores de cinco años y virtualmente se encuentra distribuido a nivel mundial. El INS, ente regulador de la vigilancia epidemiológica en Colombia, reporta en el 2015 una prevalencia de HMPV del 3,9% a 4,5% en la población general, esto sin discriminar por edad u otros datos socio-demográficos. Según el BES (boletín epidemiológico semanal) del INS, en la semana epidemiológica 52 del 2015, se estableció una morbilidad acumulada por IRA causada principalmente por agentes virales en el 63% de los casos, que

corresponden principalmente a RSV (52,1 %), HMPV (3,9 %) y otros virus (7%).

En Colombia se han descrito reportes de casos de IRA asociados al HMPV⁴, sin embargo sólo hasta el 2014, Barbosa *et al*⁵ realizaron un estudio epidemiológico específico para RSV y HMPV a nivel nacional, que incluyó muestras desde el 2000 al 2011. En éste estudio se encontró HMPV en 19 muestras de 528 individuos desde los 18 meses hasta 86 años de edad. Además, éste estudio pionero encontró cinco infecciones mixtas con RSV y HMPV en menores de cinco años, sin embargo no se describieron características de evolución clínica de ninguno de los casos.

Es importante establecer el agente etiológico de una IRA ya que el manejo y tratamiento varía dependiendo de un microorganismo a otro, es decir, para agentes bacterianos existen antibióticos que limitan y eliminan la causa de la infección, por el contrario para los agentes virales no existe un tratamiento terapéutico específico efectivo. Estas infecciones virales se tratan con medidas de tratamiento de soporte, y algunas veces ventilación mecánica y administración de oxígeno, pero generalmente tratan de manera ambulatoria, contrario que las infecciones bacterianas que requieren administrar antibióticos. La reducción en días de hospitalización y aislamiento, y de uso de antibióticos son consecuencias positivas tras el diagnóstico de un agente viral en comparación con un agente bacteriano.

Por lo tanto, este trabajo de investigación quiere estimar la prevalencia de HMPV como agente etiológico viral de IRA en menores de dos años con impacto en el manejo clínico de estas infecciones y aporte en la evidencia epidemiológica para la preparación del país a la introducción de futuras vacunas que prevengan los casos graves y muertes por estos virus.

2 Estado del arte

Las IRA de vías bajas continúan siendo la primer causa de mortalidad en enfermedades transmisibles y la tercer causa de muerte a nivel mundial aportando 3.2 millones de muertes en el 2015 ⁶⁻⁸. Según el “Global Health Observatory data repository” de la OMS¹, en Colombia la IRA es la primer causa infecciosa de muerte en niños menores de cinco años (17,5%) seguida por la enfermedad diarreica aguda (4.5%). Los virus son los patógenos más frecuentemente asociados a las IRA ^{9,10} y dentro de ellos, el RSV, FluA, FluB y los PIV son los más asociados a IRA de vías bajas y bronquiolitis ^{11,12}. Nuevos virus han entrado en esta lista destacándose desde el 2001 al HMPV ^{3,13}.

HMPV se ha detectado alrededor de todo el mundo, y desde su descripción muchos países han realizado estudios epidemiológicos para determinar la prevalencia en su región¹⁴. Estudios de seroprevalencia han demostrado la circulación de HMPV en seres humanos por al menos 50 años³ y en todos los grupos de edad, postulando que virtualmente a los cinco años todos los niños han estado en contacto con el virus ^{3,15}. HMPV hace parte de la misma familia taxonómica que RSV, familia *Pneumoviridae* (antigua subfamilia *Pneumovirinae*) reconocida oficialmente desde el 2016¹⁶. Su cercanía filogenética con RSV le ha valido a HMPV establecer muchas de sus características con base en el conocimiento que se tiene de RSV ¹⁷. A pesar de ello, muchos estudios han tomado base desde su descubrimiento y las nuevas tecnologías de laboratorio han permitido que el conocimiento sobre HMPV aumente rápidamente ^{18,19}. Sin embargo, aún se tienen brechas en este conocimiento, algunas tan básicas como su prevalencia en la población hasta las características moleculares de sus proteínas.

En Colombia, desde 1997 el Laboratorio de Virología del INS realiza la vigilancia en salud pública de las IRA mediante centros centinelas, evaluando la presencia de virus respiratorios por IFA y técnicas de biología molecular como PCR ²⁰. El INS hace la determinación de RSV, FluA y FluB, PIV, AdV y recientemente HMPV, enterovirus,

coronavirus, bocavirus y rinovirus mediante el “Protocolo de vigilancia en salud pública de infección respiratoria aguda” PRO-R02.010, versión 05 de 2016-05-03²⁰ regulando la actividad de vigilancia activa para virus respiratorios. Las muestras e información son recolectadas a través de los laboratorios de salud pública ubicados en los departamentos de Amazonas, Antioquia, Arauca, Atlántico, Caldas, Cesar, Cundinamarca, Guaviare, Huila, Norte de Santander, Santander, Nariño, Risaralda, Tolima, Valle del Cauca, y Bogotá como la capital del país. En Cali, capital del Valle del Cauca se cuenta con dos centros centinelas: la Fundación Clínica Valle del Lili y el Centro de Salud de Siloé, quienes remiten muestras en el contexto de enfermedad similar a influenza (ESI), IRA grave (IRAG) e IRA inusitado. Desde 1997 y hasta el 2007 el criterio de recolección de muestras incluía sólo niños menores de cinco años y a partir del 2007 se amplía el criterio a todos los rangos de edad con el fin de tener una estimación global de la circulación de virus en el país.

La información recolectada por el INS se reporta por semana epidemiológica a través del Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) en términos de morbilidad y mortalidad asociada a IRA. A pesar de estos esfuerzos poco se conoce sobre la prevalencia de virus diferentes a Influenza y su circulación en el país; por ejemplo para el 2017 el reporte del SIVIGILA no especifica el tipo de virus circulante, la prevalencia viral o temporalidad de los mismos. Sin embargo el INS continua implementando estrategias para establecer una buena vigilancia virológica nacional, la última directriz sobre virus respiratorios (circular 0027 del 23 de junio 2016) estableció que *“A todo paciente que ingrese a la unidad de cuidados intensivos o intermedios con diagnóstico de IRA de etiología desconocida se le debe recolectar una muestra de aspirado nasofaríngeo o lavado-broncoalveolar (para el diagnóstico virológico). Las IPS donde se encuentre hospitalizado (el paciente) deberá contar con laboratorio clínico para realizar la identificación de los virus”*. Además, se le da responsabilidad a los laboratorios clínicos de realizar las pruebas de identificación viral, reportar los resultados mensualmente al INS y remitir el 100% de las muestras positivas y el 10% de las negativas hasta su sede en Bogotá.

Con todas estas medidas para asegurar la vigilancia viral en el país no hay duda que la circulación viral es un tema de gran importancia en salud pública en Colombia. Sin

embargo a la fecha no se ha definido un patrón de circulación específico para HMPV, aunque en algunos países se ha reportado temporalidad para la infección con picos dentro del mes o dos meses posteriores a la temporada de RSV ²¹.

HMPV descrito inicialmente en población europea en el 2001 ha logrado un gran interés en la comunidad científica a nivel mundial. En América Latina países como México ²², Honduras, Nicaragua, El Salvador ²³, Guatemala ²⁴, Costa Rica ²⁵, Venezuela ²⁶, Ecuador ²⁷, Perú ²⁸, Brasil ^{29,30}, Uruguay ³¹, Paraguay ³², Chile ³³ y Argentina ³⁴ han descrito su frecuencia, cepas circulantes y características clínicas. La proporción estimada de infecciones positivas por HMPV varía entre 2,9% en Perú hasta un 17% en el sureste de Brasil, con métodos de detección desde la IFA a la PCR siendo la mayoría de estos estudios en población pediátrica, niños menores de cinco años quienes suponen ser la población más vulnerable a la infección, junto a los adultos mayores de 65 años y personas inmunocomprometidas ¹⁹.

Colombia ha sido de los últimos países latinoamericanos en describir la epidemiología de HMPV, con sólo dos estudios publicados: un reporte de seis casos de pacientes pediátricos con infección por HMPV confirmada por laboratorio realizado por Espinal *et al* en el 2012 ⁴ y un estudio retrospectivo del INS publicado por Barbosa *et al* en el 2014 ⁵. El estudio pionero de Barbosa *et al* describió la presencia de HMPV y RSV en muestras remitidas al INS en el contexto de la vigilancia epidemiológica de IRA, las muestras de aspirado nasofaríngeo e hisopado nasal fueron representativas de 28 de los 32 departamentos del país durante un periodo de doce años, entre el 2000 y el 2011. Se analizaron retrospectivamente 14870 muestras pero la determinación de HMPV se realizó en una submuestra de 528 muestras respiratorias divididas en dos grupos a conveniencia: RSV positivas y RSV negativas detectadas por IFA en pacientes de 18 meses a 86 años. HMPV fue detectado en 19 de las 528 muestras, 8 de ellas en el subgrupo RSV positivo y 11 de ellas en el grupo de RSV negativo. Se reportaron 14 infecciones únicas y cinco infecciones mixtas con RSV, todas las infecciones mixtas ocurrieron en pacientes menores de cinco años. La mayoría de las muestras positivas para HMPV fueron detectadas durante las épocas de lluvias en el país, en los periodos de marzo-junio y octubre-diciembre. Este estudio abarcó muestras de doce años epidemiológicos y sin embargo no fue posible establecer el

patrón de circulación debido a la baja prevalencia del virus en el estudio. HMPV fue detectado principalmente en niños menores de cinco años, y ninguna muestra de pacientes mayores de 31 años fue positiva. Dentro de las recomendaciones que se plantean es realizar un estudio de prevalencia para HMPV con representación uniforme de todos los grupos etarios y recalculando el tamaño de muestra con la frecuencia descrita en ese estudio. Una limitación de ese estudio fue que no se describieron las características clínicas de las muestras procesadas sin embargo es pertinente señalar que dichas muestras provienen de la vigilancia activa de ESI e IRAG. Además señala que la utilización de IFA debe ser sólo para propósitos de tamizaje y que la confirmación de los resultados de esta debe realizarse por otras técnicas más sensibles como por ejemplo el PCR.

Actualmente, no existe un gold standard o estándar de oro para el diagnóstico de HMPV, las técnicas en biología molecular han sido ampliamente utilizadas para la identificación viral junto a métodos tradicionales de aislamiento como el cultivo para su posterior identificación a través de secuenciación y análisis filogenético³⁵. Diferentes casas comerciales han desarrollado estuches diagnósticos (kits) que detectan desde una especie viral (singleplex) hasta todo un perfil de patógenos respiratorios bacterianos y virales (multiplex) siendo los kits de detección múltiple los más utilizados^{36,37}. En el 2013 Pillet *et al*, realizó la comparación de los seis principales kits multiplex para virus respiratorios disponibles en el momento³⁸. Se utilizaron: 1)RespiFinder® SMART 22 (Pathofinder, Maastricht, The Netherlands); 2)Seeplex® RV15 OneStep ACE Detection and Pneumobacter ACE Detection (Seegene Inc., Seoul, South Korea); 3)Magicplex RV Panel Real-time Test (Seegene Inc); 4)CLART® Pneumovir (Genomica, Madrid, Spain); 5)xTAG® Respiratory Viral Panel-RVP fast (Abbott, Rungis, France) y 6)ResPlex II Panel v2.0 (Qiagen, Hilden, Germany)^{38,39}. Los seis kits fueron comparados utilizando como gold standard el Respiratory Multi Well System r-gene® MWS (Argene/bioMérieux. Marcy l'Etoile, France) un sistema de qRT-PCR dúplex. Brevemente las técnicas utilizadas en cada kit fueron: 1) RespiFinder® SMART 22: basado en la tecnología MLPA™ (multiplex ligation-dependent probe amplification). Este kit detecta 18 virus y 4 bacterias en una sola reacción mediante el análisis de curva melting. 2) Seeplex® RV15: basado en la tecnología DPO™ (Dual Priming Oligonucleotide), detecta 15 virus respiratorios en una reacción de PCR múltiple. 3)

Magicplex® RV: es un RT-PCR en tiempo real para la detección múltiple de 29 virus respiratorios. 4) CLART® Pneumovir: basado en un PCR con detección por microarreglos. Este kit permite la detección de 17 virus respiratorios. 5) xTAG® RVP: basado en un RT-PCR multiplex en el cual los primers son quimeras con una secuencia terminal Universal Tag, lo cual permite la detección de 19 virus respiratorios mediante la lectura en el fluoranalizador Luminex xMAP. 6) ResPlex II Panel v2.0: es un RT-PCR en tiempo real para la detección múltiple de 18 virus respiratorios. El método de referencia para este estudio comparativo fue el kit MWS r-gene®: el cual se basa en la detección dúplex (dos agentes) por RT-PCR en tiempo real de FluA/FluB, RSV/HMPV, rinovirus/enterovirus, AdV/bocavirus y coronavirus/PIV. Cada par de virus se corre en un pozo diferente. Este kit tiene disponible 7 ensayos dúplex para un total de 12 patógenos detectados, 8 virus y 3 bacterias.

La mayoría de los kits para la detección molecular para HMPV se centran en las regiones conservadas del genoma viral como lo son el gen N, el gen F y el gen M que codifican para las proteínas de la Nucleocápside, la proteína de Fusión y la proteína Matriz respectivamente. Algunos kits como el xTAG® RVP utilizan una combinación de metodologías, la amplificación de secuencias por PCR y su posterior detección por fluorescencia en el Luminex® 100/200 ⁴⁰. El estudio de Pillet *et al* encontró una sensibilidad entre 54.17% y 91.67% (Seeplex® RV15 y Magicplex® RV respectivamente) mientras que la especificidad fue superior entre el 94.32% y 99.04% (Magicplex® RV y ResPlex II Panel respectivamente). Hasta la fecha sólo dos kits multiplex cuentan con validación para su uso diagnóstico por la FDA (Food and Drug Administration, USA) el xTAG® respiratory Viral Panel fast y el FilmArray Idaho Technology Inc. (Salt Lake City, UT) éste último detecta 20 patógenos respiratorios 17 virus y 3 bacterias.

Para el presente estudio se ha elegido la detección molecular del HMPV con el MWS® r-gene dado que es uno de los más usados y se ha utilizado como gold standard en varios estudios de validación^{38,39,41}. El MWS® es un ensayo dúplex (RSV/HMPV), con límite de detección (LoD 95%) para los dos subtipos de HMPV (A y B) de 2041.7 TCID₅₀/mL y 4466.8 TCID₅₀/mL, respectivamente mientras que para RSV (subtipo A) el LoD₉₅% es de 2.0 TCID₅₀/mL, y compatibilidad con el equipo

Applied Biosystems 7500 que se encuentra en el laboratorio de Virología de la Universidad del Valle. Aunque los ensayos multiplex son ampliamente utilizados por las grandes ventajas que ofrecen, se sigue prefiriendo ensayos singleplex o dúplex para ser estándares diagnósticos pues tienen menor interferencia en la lectura por sonda fluoreogénica, son ensayos más robustos, de mayor sensibilidad y confiabilidad.

En nuestro país, se ha reportado previamente la circulación del virus en población pediátrica y adulta, mediante el uso de RT-PCR e inmunofluorescencia. Sin embargo, no hay estudios donde se evalúe la población pediátrica más vulnerable para conocer claramente la prevalencia de HMPV y su papel en la morbilidad asociada a infecciones respiratorias agudas virales. Sin duda, conocer la prevalencia de HMPV contribuirá al diagnóstico clínico, la vigilancia epidemiológica y al establecimiento de indicadores en salud pública.

3 Marco Teórico

3.1 Las infecciones respiratorias agudas en población infantil

Según la definición del INS en su programa de pacientes con IRA, la IRA comprende un conjunto de enfermedades que afectan el sistema respiratorio, con una evolución menor a 15 días, principalmente causada por virus y en menor proporción por bacterias y otros microorganismos; representan una de las primeras causas de atención médica en todo el mundo, tanto en la consulta ambulatoria como en la hospitalización y se encuentran entre las primeras causas de mortalidad a nivel mundial ²⁰. La carga de enfermedad por IRA en general fue estimada para la población mundial en el 2010, resultando en 12 millones (IC95%:10.3–13.9 millones) y 3.0 millones (IC95%:2.1–4.2 millones) de hospitalizaciones por episodios de IRA severa y muy severa respectivamente ¹².

La bronquiolitis es la infección viral más común del tracto respiratorio en niños menores de dos años. Se refiere a la inflamación aguda, edema, hipersecreción de moco y necrosis de las células epiteliales que cubren los bronquios causando obstrucción de las vías aéreas ⁴². La Academia Americana de Pediatría la define como un conjunto de síntomas y signos clínicos que incluyen un pródromo respiratorio superior, seguido de un aumento del esfuerzo respiratorio y sibilancias en niños menores de dos años, pudiendo considerarse como el primer episodio de sibilancias limitado a los menores de doce meses. Cursa como una enfermedad auto-limitada, que inicia con síntomas de vías respiratorias superiores como congestión nasal, tos, rinorrea y ocasionalmente fiebre baja con una duración entre 1 a 3 días, la progresión de la enfermedad incluye sibilancias y dificultad respiratoria dando paso a los síntomas respiratorios severos como insuficiencia respiratoria e incluso la muerte ⁴². Existen diferentes etiologías virales asociadas a las IRA en niños menores de dos años, siendo el RSV el principal virus asociado a ella, sin embargo en los últimos años nuevos virus han sido descritos y representan nuevos retos de detección en el laboratorio clínico para el sistema de salud, tal es el caso del HMPV.

3.2 El Metapneumovirus humano

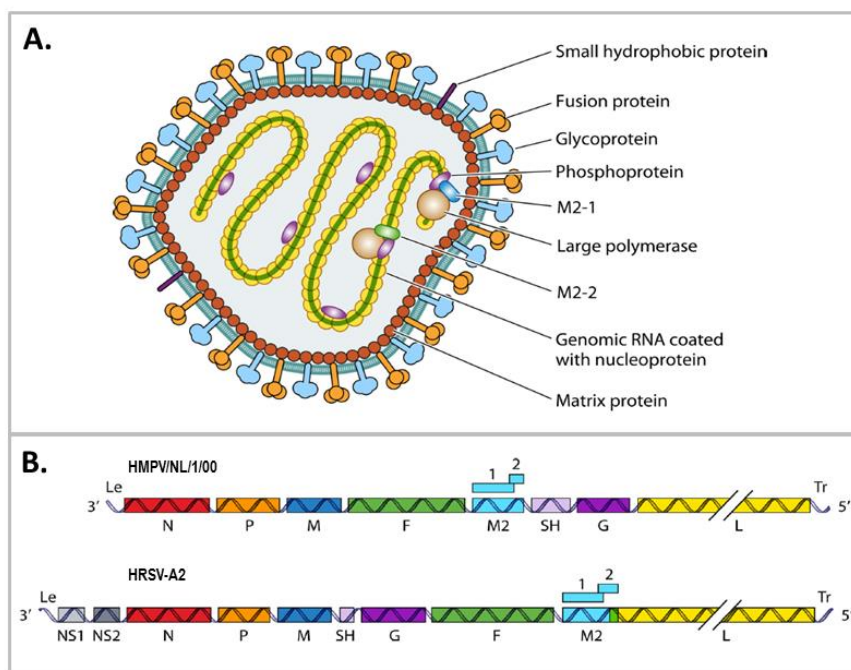
El Metapneumovirus Humano (HMPV) fue descrito por primera vez en el 2001 en Los Países Bajos por van den Hoogen *et al* ³, luego de su aislamiento a partir de 28 muestras remitidas al laboratorio de diagnóstico virológico del “Erasmus Medical Center” cuya identificación viral no había sido posible hasta el momento. Los aislados virales provenían de muestras de secreción respiratoria de niños, en su mayoría menores de cinco años, que cursaban con IRA y cuyas muestras de secreción respiratoria mostraban cambios morfológicos en los cultivos virales similares a los inducidos por el RSV pero con pruebas negativas para el mismo y otros virus respiratorios conocidos. Van de Hoogen *et al* determinaron la existencia de un nuevo virus filogenéticamente relacionado a la familia *Paramyxoviridae* (actualmente clasificado en la familia *Pneumoviridae*) utilizando técnicas de biología molecular y bioinformática, además describieron la presencia sérica de anticuerpos específicos contra el virus (seroprevalencia) en una cohorte de individuos de todas las edades en muestras del año 1958 demostrando la circulación de HMPV en seres humanos por al menos 50 años. Otros estudios alrededor del mundo han confirmado la circulación de HMPV mediante estudios de seroprevalencia en población de todas las edades utilizando entre otros la proteína F como antígeno ^{15,43–47}. Probablemente el descubrimiento de HPMV sólo ocurrió hasta el 2001 debido a la técnica de detección por cultivos celulares: su lento crecimiento y retrasado efecto citopático además de requerir tripsina para la activación de la proteína de fusión F, involucrada en la infección de nuevas células ⁴⁸.

3.2.1 Clasificación virológica

HMPV es un virus envuelto con una hebra de RNA no segmentado de polaridad negativa, con 13,280 a 13,378 nucleótidos aproximadamente, ocho genes y nueve marcos de lectura abiertos (Open Reading Frames, ORF) (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). El genoma tiene un ~80% de homología en la secuencia de aminoácidos con el Metapneumovirus aviar C (AMPV-C) para la mayoría de sus proteínas estructurales, diferenciándose en las proteínas G y SH donde la identidad en la secuencia de aminoácidos es sólo 20 a 30%. La organización

del genoma de HMPV difiere de RSV, el virus más relacionado clínicamente, en la ausencia de los dos genes no estructurales (NS1 y NS2) y el orden subsiguiente de los genes restantes ⁴⁹. Los genes de HMPV en orden son: 3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5' mientras que para RSV son 3' -N-P-M-SH-G-F-M2-L-5' (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.-B**). Los ocho genes de HMPV codifican para nueve proteínas pues el gen M2 posee dos ORF que traducen dos proteínas, M2-1 y M2-2 asociadas a la nucleocápside viral. HMPV no posee actividad hemaglutinina al igual que RSV y a diferencia de los PIV, y requiere activación con tripsina para su cultivo ³. Al microscopio electrónico se observa un virión pleomórfico entre 150 a 600 nm de diámetro recubierto en la cara interior de su envoltura lipídica por la proteína matriz M, y con proyecciones cortas de 13 a 17 nm que corresponden a las glicoproteínas de superficie F, SH y G. La nucleocápside del virus está conformada por el RNA en asociación con la nucleoproteína N, la fosfoproteína P, la polimerasa L y los factores M2-1 y M2-2 formando una simetría helicoidal de 17 nm en diámetro y 200-650 nm de largo ³.

Gráfico 1 Estructura y genoma del metapneumovirus humano



Arriba: Representación gráfica de HMPV. Abajo: Genoma de HMPV (superior) y RSV (inferior).
*Tomado y modificado de Schildgen *et al* 2011.

Pertenece al orden *Mononegavirales*, familia *Pneumoviridae* y se encuentra dentro del género *Metapneumovirus* junto a AMPV que es la especie prototipo del género ¹⁶. Para el 2016, la familia *Paramyxoviridae* fue modificada en el consenso del International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) y la subfamilia *Pneumovirinae*, a la cual pertenecían HMPV y RSV, fue promovida a familia (*Pneumoviridae*) ^{16,50}. El género *Pneumovirus* al que pertenecía RSV fue renombrado *Orthopneumovirus* mientras que el género *Metapneumovirus* no sufrió modificaciones. Al momento se reconocen dos serotipos de HMPV (HMPV-A y HMPV-B) basados en la variabilidad genética de la proteína G ⁵¹ y dentro de éstos dos subgrupos en cada uno (HMPV-A1, HMPV-A2, HMPV-B1 y HMPV-B2) debido a la variabilidad de la secuencia de la proteína G de unión y de la proteína F de fusión ^{52,53}. Posteriormente se describieron dos sublinajes para HMPV-A2: A2a y A2b basados en el análisis filogenético de los genes de la nucleocápside (N) y proteína F en cepas aisladas de población pediátrica ⁵⁴. Todos los genotipos de HMPV se han detectado circulando en América Latina ⁵⁵ y el mundo ^{29,56}.

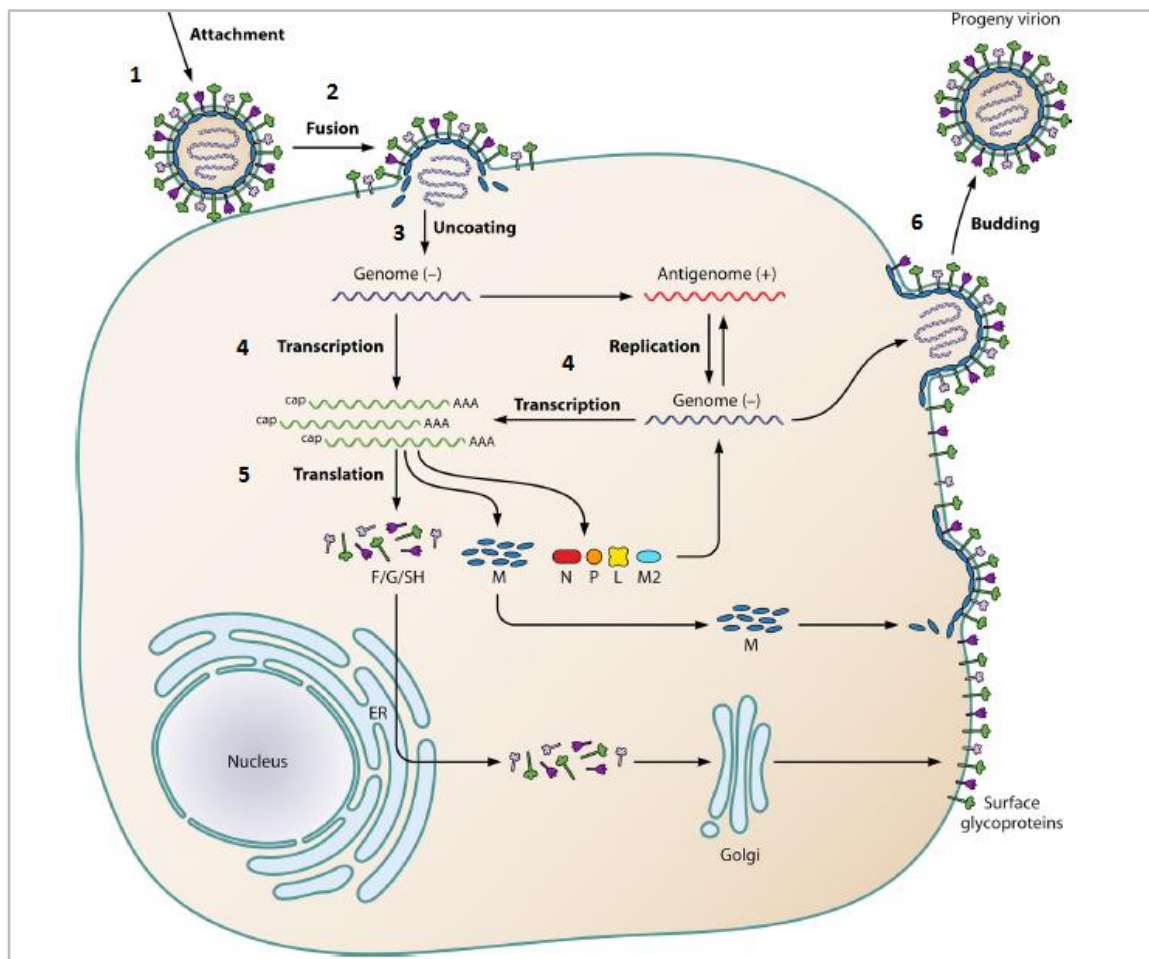
3.2.2 Epidemiología y ciclo de infección

HMPV tiene una distribución mundial, se ha detectado el virus y su seroprevalencia en la población de todos los continentes ^{3,5,15,23–34,53,57–59}. HMPV parece tener una estacionalidad similar a RSV, se han reportado brotes al final de invierno e inicio de primavera en países con estaciones ^{21,60} y durante todo el año en los países tropicales aunque más asociado a la época de lluvias ^{5,27}. Un estudio de la carga de enfermedad por HMPV realizado en U.S.A durante seis años seguidos se detectó un aumento de casos principalmente en los meses entre enero y abril coincidiendo con la estacionalidad de RSV ^{60,61}, mientras que un estudio de revisión establece que el pico epidemiológico de HMPV ocurre uno a dos meses después de la temporada de RSV ¹⁸. Por lo tanto, actualmente no se tiene un consenso en el patrón de circulación de HMPV aunque su circulación sí parece ser predominante en los meses más fríos y húmedos con o luego del pico de RSV. En Colombia, el primer reporte de HMPV fue realizado por Espinal *et al* en el 2012 ⁴, en donde se hace el reporte de seis casos de niños entre 10 meses y 6 años infectados con HMPV quienes presentaron IRA grave con sintomatología de vías respiratorias inferiores y síndrome de dificultad respiratoria

de leve a moderado, asociado a tos y taquipnea, fiebre alta y mialgias generalizadas. Posteriormente se publicó un estudio nacional por Barbosa *et al*⁵ en el 2014, el cual evaluó RSV y HMPV por RT-PCR en muestras recolectadas por un periodo de doce años, desde el 2000 hasta el 2011 donde se detectó HMPV en 19 de 528 muestras de secreción nasofaríngea.

El ciclo de replicación del HMPV es similar al de RSV y la mayoría del conocimiento que se tiene se ha obtenido a partir de homologación con otros paramixovirus incluido el RSV.

Gráfico 2. Ciclo de replicación de HMPV



Tomado y modificado de Schildgen *et al* 2011¹⁸.

Inicialmente, 1) el virión se une a la célula mediante la proteína de membrana G⁴⁸ (ver Gráfico 2). La proteína de superficie G está anclada a la membrana del virión

mediante una región hidrofóbica que está localizada cerca del extremo amino (N) terminal y compone solo un tercio de la proteína, los dos tercios restantes corresponden a su extremo carboxilo (C) terminal que se encuentra extracelular ⁶². Esta proteína G es altamente glicosilada tipo mucina, tiene un alto contenido de residuos de serina y treonina (aminoácidos polares), los cuales son potencialmente sitios aceptores de glicosilación y además tiene un alto contenido de residuos de prolina. Aunque se ha aceptado que la proteína G es la responsable de la unión del virión a la membrana celular, cepas recombinantes que no poseen la proteína G pueden replicarse in-vitro e in-vivo, lo cual pudiese ser un indicativo de que la unión a la célula no es dependiente exclusivamente de la proteína G y que ésta no es requerida para la replicación viral ⁶². Se ha propuesto que los glicosaminoglicanos celulares, como las moléculas tipo heparin-sulfato actúan como receptores en la célula ⁶³. Luego de la unión a través de la proteína G ocurre 2) la fusión de membranas mediado por la proteína F. Esta proteína F del HMPV se clasifica dentro de las proteínas de fusión clase I, donde la proteína es sintetizada como un precursor llamado F0 que requiere ser clivado por proteasas para activarse en dos subunidades F1 y F2 unidas por un puente disulfuro, lo cual induce un cambio conformacional en la proteína y permite la fusión entre las bicapas lipídicas del virión y la célula ⁶⁴. La proteína F del HMPV parece requerir activación exógena de una proteasa, lo cual se ha demostrado in-vitro ya que los cultivos celulares requieren tripsina para mantener la infección. El motivo de clivaje de la proteína F de HMPV (RQSR↓F) contiene un sitio tipo furina, característico de todos los paramixovirus (RXXR↓F). El estudio de Cseke *et al* ⁶⁵, demostró que la proteína F puede unirse a la célula eucariota a través de la integrina $\alpha V\beta 1$ mediante un motivo conservado de Arg-Gly-Asp (RGD). Esta fusión de membranas mediada por la proteína F, entre la membrana celular y la envoltura viral, ocurre a pH neutro en la mayoría de los paramixovirus. En la cepa de referencia HMPV CAN 97-83 se demostró formación de sincicios a pH bajo ⁶⁶. Ésta dependencia de pH bajo parece estar restringida a algunas cepas de laboratorio que contienen una substitución E294G en la proteína F ⁶⁶. Además de las proteínas F y G, HMPV tiene una tercera proteína de superficie, la proteína SH. La proteína SH de HMPV tiene un alto contenido de treonina/serina similar a la proteína G. Aun no hay consenso sobre la función de la proteína SH, sin embargo, al infectar ratones con una cepa recombinante sin esta proteína se encontró un aumento en la secreción de

citoquinas proinflamatorias al compararlas con los ratones infectados con la cepa salvaje ⁶⁷, indicando así que la proteína SH no es requerida para la replicación viral pero que pudiese tener un papel importante en la regulación de la respuesta inmune del hospedero ante la infección por HMPV. Luego de la fusión de las membranas, 3) la ribonucleoproteína viral que contiene el RNA de polaridad negativa (vRNA) se libera en el citoplasma, donde se transcribe a RNA mensajero (mRNA) y a RNA antigenómico (de polaridad positiva). La mayoría del conocimiento de la transcripción de HMPV es inferida del conocimiento de otros paramixovirus y en especial RSV. 4) El genoma de HMPV contiene una secuencia líder y tráiler en su terminal que son parcialmente complementarias, los cuales permiten el direccionamiento hacia RNA de polaridad positiva o negativa y de esta manera actúan como promotores directos de transcripción de mRNA y cRNA o vRNA respectivamente. Las proteínas L, P y N son necesarias para la replicación viral mientras que la función de la proteína M2-1 aún no está definida pero no es necesaria para la replicación ⁶⁸. En RSV, esta última proteína tiene una función de promotor de transcripción, pero esto no ha sido descrito en HPMV. Además del ORF de M2-1, el gen M2 tiene un segundo ORF, M2-2. Para RSV, parece que M2-2 se encarga realizar la polarización de la síntesis de mRNA a vRNA. 5) El mRNA se traduce con los mecanismos celulares y las proteínas de la envoltura G, F y SH son procesadas en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi. Posteriormente se da 6) el proceso de ensamblaje y gemación del virión mediante mecanismos similares a otros paramixovirus ⁴⁸.

3.2.3 Características clínicas de la infección por HMPV y enfermedades asociadas

HMPV se transmite por contacto directo o cercano con secreciones nasales o de saliva contaminadas, y hasta el momento se acepta que su periodo de incubación comprende de cuatro a seis días y su periodo de excreción desde cinco días hasta dos semanas¹⁸. La infección por HMPV es indistinguible clínicamente de la generada por otros virus respiratorios, principalmente de la generada por RSV ⁶⁹. La sintomatología abarca desde síntomas respiratorios de vías hasta síntomas de vías respiratorias bajas; es decir que el espectro de presentación clínica varía desde leve como un resfriado común hasta infecciones respiratorias agudas graves e incluso neumonía grave ⁷⁰. Los principales síntomas asociados a HMPV son tos, congestión

nasal, sibilancias, odinofagia y en ocasiones fiebre. Uno de los principales problemas que se presentan durante el proceso infeccioso, es la dificultad de generar una respuesta inmunitaria de memoria duradera, por lo cual se presentan re-infecciones a lo largo de la vida del individuo. A pesar de la alta carga de enfermedad y prevalencia de este virus, en la actualidad no existe un tratamiento terapéutico ni una vacuna para el manejo de la infección por HMPV.

La infección por HMPV suele estar restringida al sistema respiratorio (las células del epitelio pseudoestratificado ciliado y neumocitos tipo II) ⁷¹ y los diagnósticos clínicos más asociados son bronquiolitis, neumonía, enfermedad similar a influenza laringotraqueobronquitis (crup) y exacerbaciones del asma, especialmente en niños menores de cinco años, adultos mayores y personas inmunocomprometidas ^{72,73}. Incluso, la infección por HMPV se ha asociado al desarrollo de asma durante la infancia ⁷⁴. Los niños infectados con HMPV suelen ser mayores que aquellos infectados con RSV y característicamente se presenta más en niños que en niñas. Los casos más severos se han relacionado a comorbilidades cardíacas o del sistema respiratorio y a factores de riesgo como prematurez, desnutrición y alteraciones inmunológicas ⁷⁵. En general, la infección por HMPV suele ser más leve comparada con la enfermedad causada por RSV ⁷⁶. En algunos casos se ha detectado infección por HMPV por fuera del sistema respiratorio, principalmente en oído ⁷⁷ y el sistema nervioso central ⁷⁸ causando otitis media y epilepsia respectivamente.

HMPV y RSV se han asociado en infecciones virales mixtas ⁷⁹, y varios estudios reportan co-infecciones con tasas desde el 5 hasta el 14% ^{59,80}. El tema de las co-infecciones entre HMPV y RSV es controversial, según Semple *et al* en el 2005 ⁸¹ dicha co-infección es de peor pronóstico para el paciente, en términos de estancia hospitalaria, traslado a UCI y necesidad de ventilación mecánica. Por el contrario, un estudio en los Países Bajos por van Woensel *et al* ⁸² en el 2006 en una cohorte de 30 niños hospitalizados por IRA de vías bajas con ventilación mecánica y diagnóstico de RSV confirmado IFA y RT-PCR, no detectó ninguna co-infección de HMPV con RSV que pudiese explicar la severidad de los niños utilizando RT-PCR. Además, un estudio prospectivo de dos años en niños hospitalizados por IRA que si identificó co-infecciones entre RSV y HMPV encontró una relación de menor severidad entre la

enfermedad de los niños con infección viral mixta que aquellos infectados con una sola especie viral (RSV) ⁸⁰. Por tanto, no se ha llegado a un consenso sobre si las infecciones virales mixtas acarrearán una mayor carga de enfermedad a los pacientes o si son las comorbilidades quienes tienen mayor peso en la severidad de la enfermedad.

3.2.4 Tratamientos y desarrollo de vacunas

A nivel mundial existen hasta 23 candidatos a vacunas para HMPV con sólo uno en desarrollo clínico ⁸³ y alrededor de 60 candidatos a vacunas para RSV, 16 de los cuales ya están en desarrollo clínico ⁸⁴. El desarrollo de vacunas para HMPV se ha basado en la experiencia vacunal con RSV obteniendo resultados similares a los obtenidos para RSV, el estudio más representativo de esto es el de Yim *et al* en el 2007 quienes evaluaron una cepa de HMPV inactivada con formalina en ratones de laboratorio ⁸⁵ obteniendo resultados similares a la famosa vacuna inactivada con formalina para RSV que se evaluó en humanos en los años 60 ⁸⁶, dando una respuesta inmune de hipersensibilidad que exacerbó la enfermedad en los individuos evaluados. Otras vacunas para HMPV han llegado a fase clínica I, el primer ensayo clínico se realizó en 2013 por Talaat *et al* ⁸⁷ en un grupo de 21 adultos sanos con una cepa viva atenuada recombinante para la proteína SH que sólo generó anticuerpos neutralizantes en 30% de los individuos, y posteriormente en el 2017 un grupo del *National Institutes for Health* (NIH, USA) evaluó en fase clínica I un candidato a vacuna viva atenuada quimera con la proteína P del metapneumovirus aviar C (AMPV-C) en niños seroprevalentes y seronegativos para HMPV entre el 2011-2014 la cual no generó respuesta inmune protectora en los individuos probablemente por la sobreatenuación de la cepa. Al parecer los candidatos más prometedores son las vacunas basadas en VLP (*virus like particles*) a partir de las proteínas F y G de HMPV probadas en ratones los cuales tuvieron altos niveles de anticuerpos neutralizantes y un bajo título viral en pulmones luego de la exposición a HMPV comparado con los controles ⁸⁸. En contraparte, los candidatos a vacunas para RSV se encuentran en estadios más avanzados que la de HMPV, el candidato más avanzado es una vacuna para inmunización materna la cual está en fase III (prueba clínica en una gran población) desde finales del 2015 y del cual se esperan resultados en 2-4 años; seguido por el desarrollo de anticuerpos monoclonales para la prevención de RSV estrategia similar al

actual Palivizumab y por último candidatos a vacuna pediátrica y para adultos mayores también en fase III y finalización en 2017 ⁸⁹.

También se han explorado estrategias para generar inmunidad simultáneamente para HMPV y RSV, un estudio en 2013 purificó un anticuerpo neutralizante (MPE8) de amplio espectro a partir de donantes humanos que neutralizaba exitosamente cuatro paramixovirus (HMPV, RSV, BRSV y PMV) y ocho veces más potente que el Palivizumab ⁹⁰; en 2016 una novedosa proteína quimera entre la proteína F de HMPV con el epítipo II/A de la proteína F de RSV (RPM-1) fue evaluado en ratones BALB/c generando altos títulos de anticuerpos neutralizantes contra HMPV pero insuficientes para RSV ⁹¹ y recientemente en 2017 otro anticuerpo con capacidad de inmunidad cruzada entre HMPV y RSV fue descrito (25P13) de unirse a la proteína F en la conformación pre-fusión y post-fusión ⁹².

3.2.5 Métodos diagnósticos para HMPV

El diagnóstico específico HMPV y de otros virus respiratorios se realiza mediante la detección de antígenos, proteínas o secuencias específicas del genoma viral en las secreciones respiratorias ⁴⁸. El aislamiento viral, la IFA y las técnicas de biología molecular son los métodos de detección viral más utilizados en la actualidad, de éstas técnicas la IFA se prefiere en el diagnóstico de rutina por su rapidez y sensibilidad. Sin embargo, el aislamiento viral se ha considerado tradicionalmente como la técnica de referencia en virología ya que permite realizar estudios subsiguientes que permiten conocer a mayor detalle el virus. El aislamiento viral de HMPV puede realizarse en diferentes líneas celulares, las más permisivas son las LLC-MK2 (células epiteliales de riñón de mono *Rhesus*) y las células Vero (células de riñón de mono verde africano)¹⁸; además otras líneas celulares como las células BEAS-2B (células epiteliales de pulmón humanas), células A549 (células de carcinoma pulmonar humano) y células HepG2 (línea celular de cáncer hepático humano)⁹³ también soportan la infección. Una característica importante para el cultivo celular de HMPV es la adición de tripsina como proteasa en el medio de mantenimiento. Algunos de las limitaciones en la identificación de este virus, son su lento crecimiento in vitro y bajo efecto citopático (estructuras similares a

sincicios) dado su lento crecimiento⁴⁸. El aislamiento del virus a partir muestras clínicas resulta difícil y requiere un tiempo prolongado (de 10 a 14 días), por esto el diagnóstico se basa principalmente en técnicas de inmunofluorescencia para la detección de antígenos y técnicas de biología molecular para la detección del ácido nucleico viral.

Las técnicas de inmunofluorescencia y biología molecular han sido ampliamente utilizadas para la determinación viral y han sido las técnicas de elección para su diagnóstico desde su descubrimiento, dado que actualmente no existe un “gold standard” para el diagnóstico de HMPV. La inmunofluorescencia directa de HMPV consiste en la detección de un antígeno viral de HMPV por un anticuerpo monoclonal de ratón específico (Ac primario) marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), la IFA se observa bajo el microscopio de fluorescencia con filtro y opcionalmente se utiliza una contratinción con azul de Evans para observar toda la estructura celular lo cual facilita al observador realizar el diagnóstico viral. Si bien, la IFA es la técnica más usada, debido a que es la más rápida, su sensibilidad y especificidad varían dependiendo de muchos factores dentro de ellos, la experiencia al identificar el virus por parte del evaluador. Por otro lado, la PCR utiliza la amplificación específica de una porción del genoma viral (cDNA) para la identificación del virus, ya que HMPV es un virus de RNA de polaridad negativa requiere una transcripción reversa de RNA a un DNA copia que permite la reacción en cadena de la polimerasa.

Diferentes casas comerciales han desarrollado estuches diagnósticos tanto de IFA y PCR para la identificación de HMPV. Para PCR los kits más utilizados son ensayos que detectan sólo a HMPV (singleplex), HMPV y RSV (dúplex) y HMPV y otros virus o bacterias (multiplex), siendo éstos últimos los ensayos más utilizados en la práctica clínica como pruebas tamizaje ya que permiten descartar varios agentes infecciosos al mismo tiempo, además de la alta frecuencia de infecciones mixtas descritas entre 13% hasta un 18% ^{36,37}. Los kits disponibles hasta el momento se detallan en el estado del arte.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar la presencia de Metapneumovirus humano (HMPV) como agente etiológico viral de las infecciones respiratorias agudas (IRA) en la población infantil más susceptible que consulta una institución hospitalaria nivel III

4.2 Objetivos específicos

- Objetivo 1: Determinar la prevalencia del HMPV en niños menores de dos años con signos y síntomas de IRA que consultan la sala de urgencias pediátricas de una institución hospitalaria nivel III en Cali durante las primeras veinte semanas epidemiológicas del 2017..
- Objetivo 2: Describir las características clínicas, de severidad, desenlace clínico y ocurrencia de infecciones virales mixtas en niños menores de dos años con IRA por HMPV y otros virus respiratorios.
- Objetivo 3: Evaluar el desempeño diagnóstico de una prueba molecular de RT-PCR en tiempo real para HMPV comparada con la Inmunofluorescencia directa para detectar infecciones por HMPV niños menores de dos años.

5 Metodología

5.1 Tipo de estudio

Este trabajo es un estudio descriptivo exploratorio con un componente prospectivo y otro retrospectivo en el que se determinó la frecuencia del HMPV en IRA, durante las primeras 20 semanas epidemiológicas del 2017. La prevalencia del HMPV se evaluó prospectivamente en pacientes de la sala de urgencias pediátricas en el Hospital Universitario del Valle (HUV). Además se incluyeron muestras retrospectivas para realizar una evaluación del impacto del sistema de colección de la secreción respiratoria en la positividad del ensayo de IFA. Conjuntamente se evaluó el desempeño diagnóstico de una prueba diagnóstica molecular comercialmente disponible para la detección de HMPV (RT-PCR en tiempo real) versus la IFA. En este trabajo además se explora el comportamiento de algunas variables clínicas importantes como severidad de la enfermedad, días de hospitalización, entre otras, en una infección viral positiva por HMPV en los pacientes incluidos en el estudio. El carácter exploratorio de este estudio se justifica por la escasa o ausente información epidemiológica sobre las infecciones respiratorias causadas por HMPV en la ciudad de Cali y en Colombia en general, y se centra especialmente en la población infantil menor de dos años quienes sufren las mayores consecuencias de morbilidad y mortalidad por IRA. Adicionalmente, la información sobre la prevalencia de HMPV es de utilidad para el diagnóstico diferencial con RSV, también causante de bronquiolitis y considerada la causa más importante de morbilidad y mortalidad actualmente. RSV tiene tratamiento en los niños de más riesgo y está cercana la introducción de la vacuna.

5.2 Fuentes de datos

La recolección de los datos se realizó mediante un Formato de Reporte de Caso (CRF) en el que se registró la información de forma manual a partir de la historia clínica diligenciada en el sistema de registro de pacientes del HUV previa autorización de la institución. Se incluye la información de todos los niños menores de dos años que asistieron entre la semana epidemiológica 0 y 20 del 2017 (enero-mayo) a la sala de

urgencias pediátricas del HUV en Cali con signos y síntomas de IRA viral y a quienes se les colectó muestra de secreción nasofaríngea para diagnóstico de virus respiratorios en el laboratorio Virología, Departamento de Microbiología, Universidad del Valle.

5.3 Área de estudio

Este estudio fue realizado en la sala de urgencias pediátricas del HUV durante las primeras 20 semanas epidemiológicas del 2017 (enero a mayo). El HUV recibe principalmente población en vulnerabilidad socioeconómica y es la institución hospitalaria pública más importante en el suroccidente colombiano, acoge a la población todo el departamento del Valle del Cauca y además de los departamentos de Cauca, Nariño, Putumayo, Huila y Caquetá.

5.4 Población y muestra

a) Población de estudio

La población del estudio incluyó a todos los pacientes con signos y síntomas de IRA menores de dos años con orden médica para la realización del examen “tamizaje para virus respiratorios” o equivalente. Se incluyeron los pacientes que consultaron la sala de urgencias pediátricas del HUV durante las primeras 20 semanas epidemiológicas de 2017 (hasta completar el tamaño de muestra calculado) que cumplieron con los criterios de inclusión. Los pacientes fueron identificados por los residentes de pediatría en la sala de urgencias pediátricas con asesoría del pediatra de planta y seleccionados para el estudio por el personal capacitado y autorizado para tal. La mayoría de éstos pacientes pertenecen al régimen subsidiado de salud en Colombia. En total 106 pacientes fueron incluidos de los cuales se obtuvo una muestra de secreción nasofaríngea obtenida por succión con sonda nasogástrica estéril (terapeuta respiratoria) y transportadas en cadena de frío al laboratorio de Virología embebidas en medio de transporte viral estéril.

Muestras colectadas por hisopado nasal: Con el propósito de determinar la frecuencia de HMPV en el año inmediatamente anterior (2016) y evaluar el impacto del tipo de muestra en la positividad de la IFA directa para HMPV, se evaluaron retrospectivamente 64 muestras del 2016 (correspondientes a las muestras de todo el 2016) y 32 muestras del 2017 (semanas epidemiológicas 1 a 13) del biobanco del laboratorio de Virología. Todas las muestras habían sido obtenidas por hisopado nasal y ya habían sido evaluadas para los virus respiratorios más comunes, excepto para HMPV. A partir de láminas portaobjetos para fluorescencia con impresiones de las células epiteliales extraídas de los hisopos, previamente fijadas y conservadas congeladas a -20°C se realizó la tinción para HMPV. La selección de las muestras se realizó cumpliendo los mismos criterios de inclusión que las de las muestras obtenidas prospectivamente en los niños hospitalizados.

b) *Criterios de inclusión*

- Niños de ambos sexos menores de dos años (entre 0 y 24 meses de edad)
- Consulta por IRA (signos y síntomas sugestivos de infección respiratoria aguda clínica) con o sin diagnóstico registrado en la historia clínica código CIE-10: J00 a J06, J09 a J12 y J20 a J22.
- Solicitud de “tamizaje para virus respiratorios”, “panel viral”, “examen para RSV” o equivalente.

c) *Criterios de exclusión*

- Episodio de IRA con duración mayor a 20 días.
- Neonatos hospitalizados desde el nacimiento.
- Pacientes con IRA de etiología bacteriana confirmada por laboratorio.
- Pacientes con fiebre y neutropenia post-quimioterapia.
- Incapacidad anatómica de proveer muestra de secreciones respiratorias.

d) *Unidad de muestreo y de análisis*

La unidad de muestreo correspondió a niños de 0 a 24 meses que cumplieron los criterios de inclusión, y la unidad de análisis corresponde a muestras de secreción nasofaríngea.

e) *Tamaño de muestra*

Se calculó un tamaño de muestra para estimar la prevalencia de HMPV, basados en un porcentaje esperado de IRA causadas por HMPV de aproximadamente 4%, un nivel de confianza del 95% y un error máximo tolerable del 3.74%.

$$n \geq \frac{(Z_{\alpha/2})^2 PQ}{e^2}$$

Dónde:

- $1 - \alpha$: Nivel de confianza
- $Z_{1-\alpha/2}$: Percentil $1 - \alpha/2$ de la distribución normal estándar
- P : Proporción esperada
- e : Error máximo tolerable

Entonces,

$$n \geq \frac{(1.96)^2(0.04)(0.96)}{(0.0374)^2} = 105.5 \cong 106$$

Por tanto se obtuvieron y analizaron 106 muestras las cuales se completaron durante el primer semestre del 2017. El carácter de este estudio fue exploratorio.

f) *Manejo de datos*

A todos individuos incluidos en el estudio se les asignó a un código consecutivo y todos sus datos personales fueron fijados a dicho código. La relación código e identificación de cada voluntario se consignó en una base de datos física y digital, a las cuales solo tuvo acceso el investigador principal y el profesional que informó el resultado al médico tratante. El formato de recolección de información clínica (CRF por sus siglas en inglés) descrito en el Anexo 1, se diligenció en físico manualmente, este formato incluye información sociodemográfica y clínica como

identificación, edad, sexo, antecedentes perinatales importantes, parámetros clínicos como temperatura, frecuencia respiratoria, auscultación, duración de hospitalización, necesidad de admisión a unidad de cuidados intensivos, descripción de la radiografía y ventilación mecánica. Y parámetros de laboratorio como hemograma y concentración de proteína c reactiva. La base de datos física se encuentra bajo la custodia del laboratorio de Virología de la Universidad del Valle.

5.5 Definición de variables

Inicialmente se realizó por IFA la determinación de los ocho virus respiratorios más relevantes, incluyendo el HMPV, para determinar la etiología viral de la IRA y emitir un diagnóstico clínico para el paciente; luego por lotes de muestras se realizó el RT-PCR en tiempo real para HMPV. Se describen la frecuencia de positividad viral para HMPV y los principales virus respiratorios, también algunos parámetros clínicos como signos y síntomas, tiempo de hospitalización, requerimiento de oxígeno, traslado a UCI, severidad de la enfermedad, los cuales permiten establecer el impacto clínico de la IRA en niños menores de dos años. Además se evaluó el desempeño diagnóstico de la prueba molecular para HMPV comparado con la IFA directa y la concordancia del resultado de PCR para RSV con la IFA Indirecta. A continuación se detallan las variables consideradas más importantes para analizar en el estudio (Tabla 1).

Tabla 1. Operacionalización de las variables

Código	Variable	Definición	Tipo de variable	Escala de medición	Posibles valores de la variable
1	Código del paciente registrado en el laboratorio	Consecutivo de paciente que ingresa al estudio al cumplir los criterios de inclusión	Cualitativa	Nominal	Mayor o igual a 1
4	Sexo	Sexo anatómico del individuo	Cualitativa	Nominal	1. Masculino - 2.Femenino
5	Edad	Fecha de nacimiento	Cuantitativa	Discreta	Mayor o igual a 0 y menor o igual a 24
11	Guardería	Reporte de asistencia a la guardería o jardín escolar	Cualitativa	Nominal	1.Si - 2.No
12	Lactancia materna	Reporte de alimentación con leche materna	Cualitativa	Nominal	1.Si - 2.No
21	Prematurez	Reporte de nacimiento antes de las 37 semanas de gestación	Cualitativa	Nominal	1.Si - 2.No
24	CIE-10 inicial	Diagnostico CIE-10 registrado al ingreso	Cualitativa	Nominal	Código de tres o cuatro caracteres con una letra y mínimo dos números.
29	CIE-10 de egreso	Diagnostico CIE-10 registrado al egreso	Cualitativa	Nominal	Código de tres o cuatro caracteres con una letra y mínimo dos números.
30	Diagnóstico de trabajo	Diagnostico clínico usado durante el tratamiento del paciente en su estancia en el hospital	Cualitativa	Nominal	1.Laringotraqueobronquitis - 2.Bronquiolitis - 3.Neumonía - 4.Sepsis - 5.Síndrome tóxico - 6.Asma - 7.Sepsis de componente pulmonar - 8.(Sepsis y Sd tóxico)
31	Síntomas	Reporte o hallazgo de alguno de: tos, congestión nasal, fiebre, disnea, conjuntivitis, convulsiones, apnea, estridor, disfonía	Cualitativa	Nominal	1.Si - 2.No
32	Hemograma	Recuento absoluto de leucocitos, neutrófilos, linfocitos y monocitos	Cuantitativa	Continua	Ver Anexo 2
37	Radiografía de tórax	Reporte de hallazgos en placa de rayos x en tórax	Cualitativa	Nominal	1.No tiene - 2.Normal - 3.Engrosamiento bronquial - 4.Atelectasia - 5.Opacidades sin consolidación - 6.Consolidación - 7.Hiperaeración
38	Saturación de oxígeno	Reporte de concentración de oxígeno medida por pulsioxímetro	Cuantitativa	Continua	60-100
39	Frecuencia respiratoria	Reporte de frecuencia respiratoria en un minuto	Cuantitativa	Continua	Ver Anexo 4
40	Auscultación	Reporte de valoración en sistema respiratorio utilizando estetoscopio	Cualitativa	Ordinal	Ver Anexo 4

41	Uso de músculos accesorios	Reporte de valoración uso de músculos accesorios a la respiración	Cualitativa	Ordinal	Ver Anexo 4
42	Condición general	Reporte de percepción médica sobre la condición general del individuo.	Cualitativa	Ordinal	Ver Anexo 4
43	Muerte	Reporte de muerte	Cualitativa	Nominal	1.Si – 2.No
44	Muerte atribuible a IRA	Reporte de muerte asociada a IRA	Cualitativa	Nominal	1.Si - 2.No
46	Duración hospitalización	Duración total de hospitalización en días	Cuantitativa	Continua	mayor o igual a 0
48	Duración oxígeno	Duración total de administración de oxígeno por cánula en días	Cuantitativa	Continua	mayor o igual a 0
49	Duración UCI	Duración total de estancia en UCI en días	Cuantitativa	Continua	mayor o igual a 0
50	Salida	Reporte de alta médica del individuo	Cualitativa	Nominal	1.A casa -2.Remisión II Nivel - 3.Remisión UCI – 4.Muerte
53	Severidad en la saturación de oxígeno	Escala de severidad en la saturación de oxígeno	Cualitativa	Ordinal	Ver Anexo 4
54	Severidad de la frecuencia respiratoria en escala	Escala de severidad en la frecuencia respiratoria	Cualitativa	Ordinal	Ver Anexo 4
55	Puntaje de severidad de la enfermedad	Reporte de puntaje en escala de severidad	Cualitativa	Ordinal	0 - 15 Sumatoria de variables: (40 + 41 +42 + 53 + 54).
55.1	Severidad de la enfermedad	Reporte de grado de severidad de la enfermedad	Cualitativa	Ordinal	1.Leve - 2.Moderada - 3.Severa
60	Semana epidemiológica	semana epidemiología de procesamiento de muestra en el lab	Cuantitativa	Continua	1 a 52
62	Inmunofluorescencia (IFA)	Resultado de inmunofluorescencia para 8 virus	Cualitativa	Nominal	1. Negativo para todos los virus - 2.Positivo para FluA - 3.Positivo para FluB - 4.Positivo para RSV- 5.Positivo para AdV - 6.Positivo para PIV-1 - 7.Positivo para PIV-2 - 8.Positivo para PIV-3 - 9.Positivo para HMPV
63	PCR en tiempo real	Resultado de PCR en tiempo real para HMPV y RSV	Cualitativa	Nominal	1.Negativo - 2.Positivo para Metapneumovirus - 3.Positivo para RSV

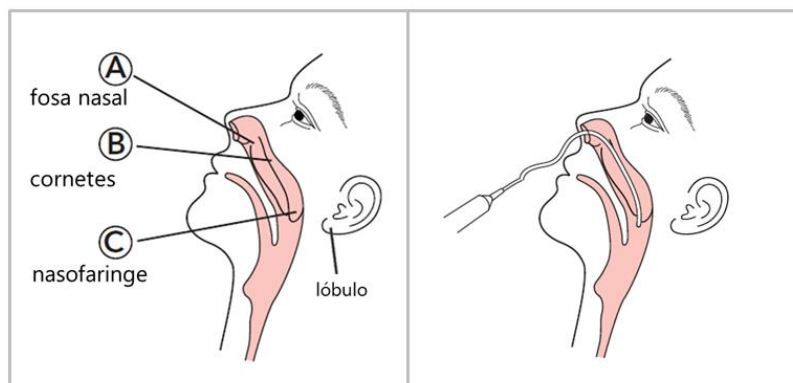
5.6 Procedimientos de laboratorio

Todos los procedimientos de laboratorio excepto la toma de muestra de secreción nasofaríngea fueron realizados en el laboratorio de Virología – Departamento de Microbiología de la Universidad del Valle.

5.6.1 *Muestra de secreción nasofaríngea*

Se utilizó el método de aspirado nasofaríngeo (ANF) para la obtención de la muestra de secreción nasofaríngea, la cual se utilizó para detectar antígenos virales por IFA y RT-PCR (Transcripción Reversa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa). Esta muestra contiene abundantes células epiteliales descamadas de la nasofaringe, y positivas para virus en los pacientes con IRA viral, detectables por ambos IFA y RT-PCR. Además, la secreción contiene también partículas virales libres detectables por la prueba de RT-PCR solamente. La toma de muestra se realizó utilizando una sonda nasogástrica estéril calibre #6 y succión por vacío, procedimiento efectuado por la terapeuta respiratoria de la institución hospitalaria. Brevemente, el procedimiento consiste en conectar la sonda a la fuente de vacío, luego sin aplicar vacío se inserta el extremo posterior libre de la sonda por una fosa nasal llevándola por el piso de la nariz hasta la nasofaringe en dirección hacia el lóbulo de la oreja, la profundidad de inserción de la sonda corresponde a la mitad de la distancia entre la fosa nasal externa y el lóbulo de la oreja (Gráfico 3). Luego se aplica succión por intervalos de máximo de 5 segundos. Se retira la sonda suavemente con movimientos circulares y se verifica que haya secreción dentro de la misma. La muestra corresponde a la secreción nasofaríngea que queda adherida al interior de la sonda por tanto debe cuidarse de no exceder el tiempo de succión por vacío y así evitar que la muestra se vaya por la manguera que conduce el vacío. Inmediatamente, se introduce la sonda dentro del vial con medio de transporte estéril (aproximadamente 5 a 7 cm de sonda), cuidando de tocar sólo interior del vial. Finalmente se corta con tijeras limpias, se tapa el vial y se mantiene en cadena de frío hasta su procesamiento en el laboratorio. Todas las muestras procesadas en este estudio se procesaron entre una a dos horas posterior a la toma de la muestra.

Gráfico 3. Lugar anatómico para la toma de muestra nasofaríngea

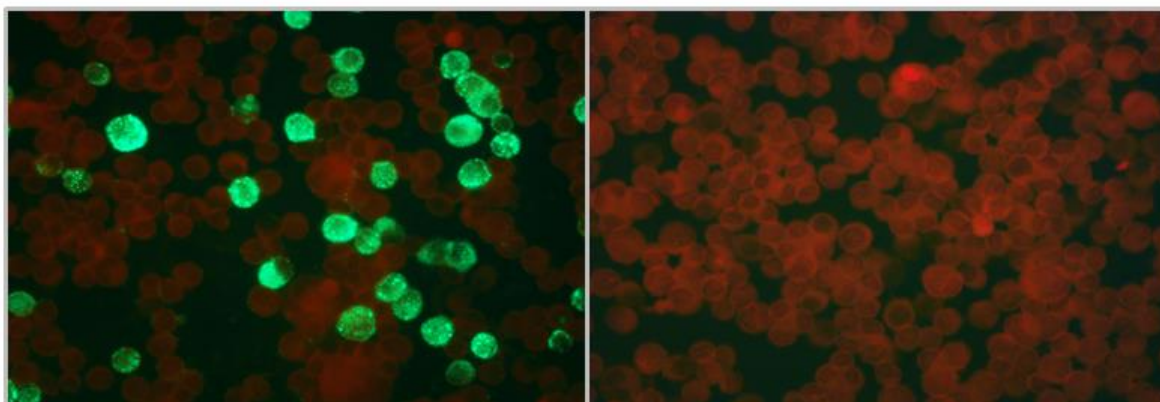


5.6.2 Inmunofluorescencia para HMPV y demás virus respiratorios

Se realizó la detección de HMPV mediante IFA directa con el estuche comercial “LIGHT DIAGNOSTICS™ Human Metapneumovirus (HMPV) Direct Immunofluorescence Assay” Cat No. 3124 (Millipore Corporation. Livingston, UK) ⁹⁴. Para la determinación de los demás virus respiratorios se utilizó paralelamente el estuche comercial de uso rutinario y avalado para diagnóstico clínico: “LIGHT DIAGNOSTICS™ Respiratory Panel I Viral Screening and Identification IFA” Cat No. 3105 (Millipore Corporation. Livingston, UK) ⁹⁵, este estuche detecta mediante IFA indirecta los siete virus respiratorios más frecuentes que son: FluA, FluB, RSV, AdV, PIV-1, PIV-2 y PIV-3.

La IFA directa para HMPV utiliza un anticuerpo monoclonal de ratón específico para un antígeno viral de HMPV (Ac primario) marcado con FITC y azul de Evans utilizado como contratinción. La IFA se observó en un microscopio de epifluorescencia (Eclipse Ni-U, Nikon, Japan) con filtro C-F B-2A, con el cual se observan células positivas (infectadas) que presentan una coloración verde manzana brillante (FITC) en el citoplasma, con un patrón moteado grueso (Gráfico 4) mientras que las células negativas para virus se tiñen de color rojo opaco por el contraste con azul de Evans.

Gráfico 4. Inmunofluorescencia positiva y negativa (40x).



Izquierda: lámina control positivo para HMPV, las células de color verde manzana brillante son positivas. Derecha: lamina control negativo para HMPV, las células de color rojo opaco son negativas. Estuche comercial Light Diagnostics™ 3124, Millipore.

Los demás virus diferentes a HMPV se detectaron mediante IFA indirecta. En la IFA indirecta se utilizan dos tipos de anticuerpos: el primero es un anticuerpo monoclonal primario producido en ratones específico para el antígeno viral, el cual se detecta con un anticuerpo secundario (Ig-G anti-ratón) obtenido en cabra marcado con FITC. El estuche contiene siete anticuerpos primarios específicos para cada virus respiratorio, los cuales son detectados con un solo anticuerpo secundario conjugado a FITC. El patrón celular de inmunofluorescencia, se interpreta igual que la IFA directa para HMPV y se observa bajo el mismo microscopio de epifluorescencia como en el Gráfico 4. Para los virus Influenza y adenovirus, la inmunofluorescencia se observa nuclear predominantemente, y no en el citoplasma como los demás virus respiratorios del panel. El estuche comercial de Light Diagnostic 3124® usado para HMPV, tiene un límite de detección viral (LoD) de 4.0×10^2 PFU/mL, 1×10^2 PFU/mL, 6.25×10^2 PFU/mL y 2.75×10^2 PFU/mL para HMPV-A1, HMPV-A2, HMPVB-B1 y MPV-B2 respectivamente. El Light Diagnostic 3105® para los demás virus respiratorios sólo describe los parámetros de validación diagnóstica como sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo (ver Anexo 3), mas no el LoD de la prueba.

5.6.3 Detección molecular del HMPV

La detección de HMPV también se realizó mediante una prueba molecular disponible comercialmente. Previo a la detección molecular se realizó la extracción del ácido

ribonucleico viral (RNA viral) mediante el kit de extracción “QIAamp® Viral RNA Mini Kit (50)” Cat. 52904 de QIAGEN® Hilden, Germany, según las instrucciones del fabricante. Para la extracción se utilizó un control negativo (mock) utilizando agua estéril como muestra, con el cual se monitorea si ocurre contaminación cruzada al realizar la extracción, el cual se somete a todos los pasos de extracción junto con las muestras a evaluar. Si al final este mock resulta positivo, se invalida el ensayo porque ocurrió contaminación cruzada. Se utilizó el estuche comercial “RSV/HMPV r-gene® Respiratory Multi Well System MWS r-gene®” Cat.71-041 de bioMérieux, Marcy l'Etoile, France. El estuche consiste en una Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Reversa en Tiempo Real (abreviado en adelante como RT-PCR en tiempo real), la cual consiste en la amplificación de una región específica del RNA viral usando tecnología TaqMan™ con sonda fluorogénica. Este estuche realiza la detección dúplex de HMPV y RSV mediante las sondas VIC® (~551nm) y FAM™ (~517nm) respectivamente. El blanco de detección para HMPV es el gen M que codifica para la proteína M o Matriz, proteína que compone la cara interna de la envoltura viral y es una de las más abundantes en el virión. Por otro lado, el blanco de detección de RSV es el gen N que codifica para la proteína N o nucleoproteína. El tamaño del fragmento amplificado es 160bp para HMPV y 184bp o 152bp para RSVA o RSVB respectivamente. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las especificaciones del fabricante, en el termociclador ABI-7500 Real Time PCR System con detección por lámpara halógena de sondas fluorogénicas y el programa 7500 Software v2.0.5 (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Software). Los detalles de la mezcla de reactivos de reacción (master mix) y programa de amplificación se encuentran en el Anexo 3. Se utilizaron cinco controles de calidad en cada ensayo procesado : i) Un control negativo de extracción del RNA ,mock, descrito anteriormente ii) un control negativo de los reactivos del RT-PCR en tiempo real (NTC o “Non Template Control”) que contiene agua en lugar de muestra, iii) un control de verificación de extracción del RNA para cada muestra que consistió en la detección del RNA para la ribonucleoproteína P (RNP) humana (consiste en un ensayo independiente de RT-PCR , con primers y programa de amplificación detallados en el Anexo 5) , iv) el control positivo provisto por el estuche comercial y v) un control positivo del laboratorio aislado a partir de una muestra confirmada.

El estuche comercial RSV/HMPV MWS r-gene® tiene pre-determinados los siguientes parámetros de validez diagnóstica para HMPV: S=85.7% y E=100%, y para RSV: S=91.3% y E=99.51% al compararlos con inmunofluorescencia directa para ambos virus ⁹⁶. La concordancia entre ambas técnicas RT-PCR en tiempo real e IFA es de 99.4% y 98.6% para HMPV y RSV respectivamente. La sensibilidad analítica o límite de detección al 95% (LoD95%) para los dos subtipos de HMPV (A y B) es de 2041.7 TCID50/mL y 4466.8 TCID50/mL, respectivamente mientras que para RSVA el LoD95% es de 2.0 TCID50/mL. La sensibilidad analítica al 5% (LoD5%) para HMPVA y HMPVB es de 109.7 TCID50/mL y LoD5%= 50.1 TCID50/mL respectivamente; para RSVA el LoD5%=0.06 TCID50/mL. Este estuche no reporta los parámetros de validez para RSVB.

5.7 Análisis y Métodos estadísticos

5.7.1 Frecuencia del HMPV y características clínicas en la población de estudio

La frecuencia del HMPV se presenta en cifras absolutas y porcentajes en una tabla de frecuencia utilizando los resultados de IFA y RT-PCR en tiempo real conjuntamente. También se describen las características generales, sociodemográficas y clínicas de los niños menores de 2 años, tales como: edad en meses, sexo, prematurez, días de evolución a la toma de muestra, paraclínicos y síntomas. La severidad de la enfermedad se describió de acuerdo a la escala estandarizada de severidad clínica descrita inicialmente por Tal *et al* ⁹⁷ y posteriormente modificada para ser utilizada en múltiples estudios ⁹⁸⁻¹⁰¹ (ver en Anexo 4) se evalúan cinco parámetros (auscultación, uso de músculos accesorios, frecuencia respiratoria, saturación de oxígeno con o sin oxígeno suplementado y condición general del niño) con un puntaje de cero a tres cada uno, la cual clasifica la enfermedad en tres grados: leve (0-5), moderada (6-10) y severa (11-15).

Previamente se analizó la normalidad de las variables de naturaleza cuantitativa y en caso de que éstas no cumplieran el supuesto de normalidad con un nivel de significancia de 0.05, se resumieron con la mediana y el rango como medida de tendencia central y de dispersión respectivamente, de lo contrario fueron

presentadas en términos del promedio y la desviación estándar. Mientras que las variables cualitativas se presentaron en tablas de frecuencias con cifras absolutas y relativas. Todos los resultados se clasificaron según las pruebas de laboratorio en cuatro categorías: i) positivo para HMPV, ii) positivo para RSV, iii) Positivo para otros virus y iv) Negativo para todos los virus examinados. En los casos en que una muestra fue positiva para dos virus (infección viral mixta) se consideró el resultado por IFA como el diagnóstico viral para presentar en las tablas de frecuencia y el análisis estadístico de los objetivos específicos 1 y 2. Adicionalmente se estimó la frecuencia de los virus evaluados según semana epidemiológica por año. Los análisis fueron realizados con STATA/SE 12.0 para Windows (2011).

5.7.1.1 *Evaluación de la positividad viral por IFA según el tipo de células del tracto respiratorio*

Se comparó La positividad viral por IFA en muestras de secreción respiratoria obtenida con hisopo , las cuales fueron evaluadas retrospectivamente, versus la positividad viral en las muestras de secreción nasofaríngea obtenidas por succión con sonda, las cuales fueron obtenidas prospectivamente. Las muestras retrospectivas se obtuvieron del biobanco del laboratorio de Virología de la Universidad del Valle y las prospectivas fueron incluidas durante el presente estudio. Se incluyeron 96 muestras retrospectivas (64 muestras de todo el 2016 y 32 muestras de las primeras 13 semanas epidemiológicas del 2017) y 106 muestras prospectivas. Todas las muestras retrospectivas fueron colectadas por hisopado nasal con hisopo de madera y torunda de algodón y las muestras prospectivas fueron tomada mediante aspirado nasofaríngeo. Se presentan los resultados de IFA para los 8 virus evaluados en este estudio incluido HMPV.

5.7.2 *Evaluación del desempeño diagnóstico de la prueba molecular*

El desempeño de la prueba diagnóstica molecular (RT-PCR en tiempo real) fue evaluado mediante la determinación de la sensibilidad y la especificidad considerando la IFA como estándar de oro. La seguridad de la prueba de RT-PCR en tiempo real se determinó a partir de los valores predictivos positivos y negativos con sus respectivos intervalos de confianza del 95%. Paralelamente la concordancia de la RT-PCR en tiempo real y la IFA fue medida mediante la

determinación del índice Kappa de Cohen sin ponderar con sus respectivos intervalos de confianza del 95%. La escala a utilizar para la interpretación de este índice es la de Landis y Koch descrita en 1977¹⁰² y se detalla en el Anexo 6. Los análisis fueron realizados con el programa estadístico de libre acceso OpenEpi 2013¹⁰³.

5.8 Consideraciones éticas

Este estudio corresponde al proyecto de investigación de quien presenta este documento. El protocolo fue aprobado por los comités de ética de la Universidad del Valle y el Hospital Universitario del Valle mediante el acta No. 015-016 del 09 de noviembre del 2016 y No. 005-2017 del 15 de mayo del 2017, respectivamente.

De acuerdo con las políticas de Colombia (Resolución No. 008430, 1993) este estudio se clasificó como riesgo mínimo debido a que implica la obtención de una muestra de secreción nasofaríngea por succión (con sonda nasogástrica) a través de un procedimiento común usado en la rutina clínica. Debido a que los sujetos eran menores de edad y para mitigar el riesgo, el personal del servicio (terapeuta respiratoria y fisioterapeuta coordinadora) con el entrenamiento respectivo estuvo siempre disponible para solucionar todos los inconvenientes que se pudiesen presentar. En esta investigación prevaleció el criterio del respeto a la dignidad, la protección de los derechos y bienestar de los pacientes, como lo contempla el artículo 5 capítulo de la misma resolución. La identidad de los pacientes se protegió con la confidencialidad, y en el transcurso de la investigación, ninguna persona ajena al equipo de trabajo, tuvo acceso a la información.

El estudio no modificó ninguno de los procedimientos que el hospital tuviese establecido para la toma de la muestra y los investigadores no tuvieron responsabilidad en los procedimientos de la misma. La toma de muestra no representa ningún riesgo para el niño ni tampoco requiere anestesia y es indoloro toda vez que no rompe la barrera del epitelio nasofaríngeo. La responsabilidad del investigador sobre la muestra se produjo a partir de su transporte, procesamiento y reporte de resultado al médico tratante. Esta muestra correspondió a la muestra de rutina solicitada con fines de

confirmar el diagnóstico clínico de virus respiratorios. Debido a esto no se requirió consentimiento informado de los padres para la colección de la muestra secreción respiratoria por parte del personal clínico. Se realizó la donación del examen de diagnóstico para virus respiratorios por IFA a todos los niños incluidos en el presente estudio. El uso del resultado de laboratorio y la información clínica y sociodemográfica relacionada con las muestras se obtuvo de manera retrospectiva y contó con la aprobación del comité de investigaciones y ética del HUV.

6 Resultados

6.1 Descripción de las características sociodemográficas y clínicas de los sujetos del estudio

Se incluyeron muestras y la información clínica de un total de 106 niños con signos y síntomas de IRA de acuerdo a la descripción del INS en su protocolo de vigilancia en salud pública ²⁰. Todos los pacientes ingresaron a la sala de urgencias pediátricas del HUV y fueron monitorizados en sala de observación por al menos un día por los médicos tratantes. En la mayoría de los casos, el motivo de consulta fue la presencia de tos acompañada o no por congestión nasal. Bronquiolitis fue el diagnóstico clínico más frecuente (56.6%), seguido por neumonía en el 20% del total de los casos. Las características demográficas y clínicas de todos los individuos del estudio se detallan a continuación en la Tabla 2; y se describen según diagnóstico viral de laboratorio en el objetivo 2 (ver subcapítulo 6.3, página 53).

Tabla 2. Características sociodemográficas y clínicas a la inclusión de niños con sospecha de IRA en las primeras 20 semanas epidemiológicas del 2017 (n=106)

Características	Estadístico
Edad en meses (mediana, min-máx.)	3 meses y 8 días aprox. (12 días-24 meses)
Sexo masculino (n, %)	68 (64.15)
Síntomas (n, %)	
- Tos	102 (96.23)
- Congestión nasal	77 (72.64)
- Dificultad respiratoria	64 (60.38)
- Fiebre	62 (58.49)
- Conjuntivitis	5 (4.72)
Diagnóstico clínico (n, %)	
- Bronquiolitis	60 (56.60)
- Neumonía	21 (19.81)
- Sepsis con compromiso pulmonar	14 (13.20)
- Asma	7 (6.60)
- Síndrome tosferinoso	3 (2.83)
- Laringotraqueobronquitis	1 (0.94)
Días desde inicio de síntomas al diagnóstico (mediana, min-máx.)	5 (1-20)
Días de estancia hospitalaria (mediana, min-máx.)	4 (1-30)

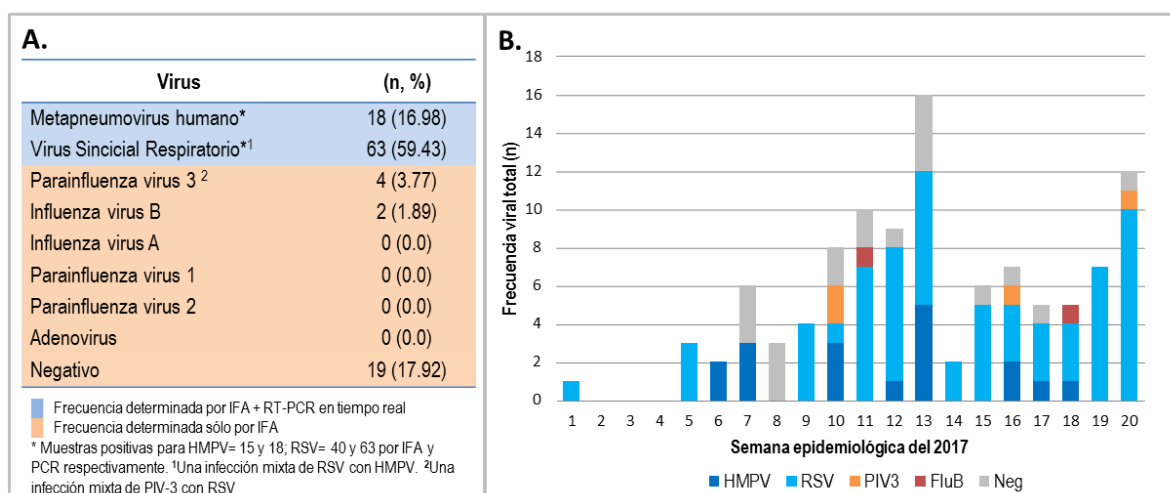
6.2 Determinación de la prevalencia del HMPV

Para estimar la prevalencia de infección por el HMPV, se utilizaron los resultados obtenidos con los dos ensayos, IFA directa y RT-PCR en tiempo real en las 106 muestras de secreción nasofaríngea.

En la Tabla 3 se resumen las frecuencias estimadas de positividad viral según semana epidemiológica. Las dos muestras con infecciones virales mixtas, en las cuales uno de los virus se detectó por IFA y el otro por RTPCR se presentan en las tablas únicamente para el virus detectado en la IFA. En general la frecuencia de infección viral fue alta, el 82.07% de los niños incluidos fueron positivos para algún virus lo cual concuerda con la sospecha clínica. Sólo 19 niños (17.92%) fueron negativos para todos los 8 virus respiratorios examinados. En total 19 niños de los 106 evaluados para este virus

tuvieron una infección positiva por HMPV, 15 de ellos por IFA y 19 por RT-PCR (un niño con infección viral mixta entre HMPV y RSV). Se estimó una prevalencia para HMPV de 16.98% (IC95%: 11.15-26.56%) en las primeras 20 semanas epidemiológicas del año, se excluye la infección viral mixta. La infección viral más frecuente en este estudio fue RSV, con una prevalencia de 59,46% (63 de 106), de ellos 40 fueron detectados por IFA y 63 por RT-PCR.

Tabla 3. Frecuencia de virus respiratorios hasta semana epidemiológica 20 de 2017.



Izquierda en panel A. Frecuencia total de virus respiratorios. Derecha en panel B. Frecuencia de virus respiratorios por semana epidemiológica.

Otros virus detectados correspondieron a 4 casos con PIV-3 (3.77%) y 2 casos con FluB (1.89%). Estos resultados indican que un 76.41% de la infecciones respiratorias virales en lactantes son causadas por RSV y HMPV.

6.2.1 Evaluación de la positividad viral por IFA según el tipo de células del tracto respiratorio

Para determinar el impacto del tipo de muestra en la positividad para HMPV en la prueba de IFA, el estudio evaluó retrospectivamente la positividad para HMPV en las muestras del biobanco del laboratorio de Virología de la Universidad del Valle incluyendo todo el 2016 y las primeras 13 semanas epidemiológicas del 2017. Las muestras del 2016 fueron colectadas por hisopado nasal (células epiteliales nasales), se incluyeron las muestras de niños menores de 2 años hospitalizados con diagnóstico

de IRA viral que cumplieron los mismos criterios de inclusión de los que se les evaluó secreción nasofaríngea (células epiteliales nasofaríngeas). Se presentan los resultados de IFA, para los 8 virus evaluados en este estudio incluido HMPV, de todas las muestras retrospectivas del biobanco del año 2016 (64 muestras) y de las primeras 13 semanas epidemiológicas del 2017 (32 muestras) para un total de 96 muestras del biobanco evaluadas. Estos resultados se comparan con los resultados para IFA de las 106 muestras de nasofaringe colectadas por succión (secreción nasofaríngea) del presente estudio durante las primeras 20 semanas epidemiológicas del 2017. Los resultados de ésta comparación se detallan en la Tabla 4 a continuación, y se muestran dos fotografías representativas del tipo de muestra en el Gráfico 5.

Tabla 4. Frecuencia viral por IFA de acuerdo al tipo de muestra (n, %)

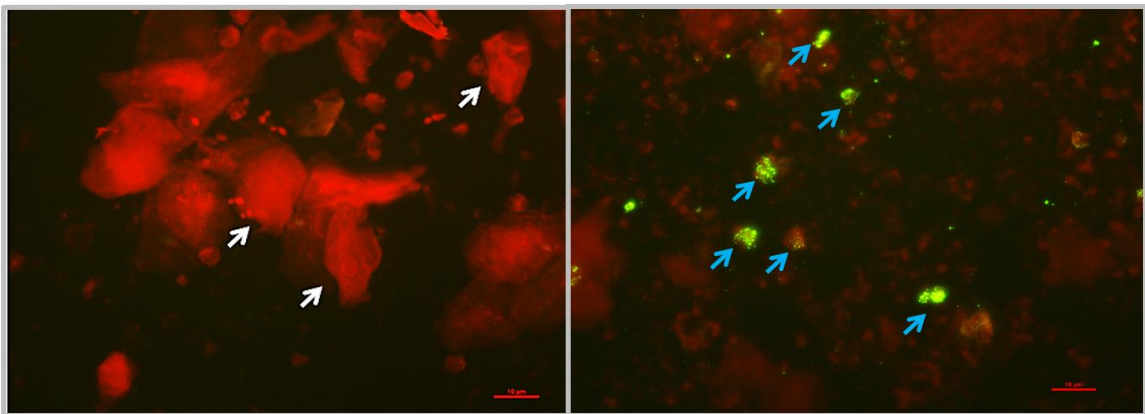
Virus	Muestra de secreción nasofaríngea (n=106)	Muestra de secreción nasal (n=96)
Metapneumovirus humano	15 (14.15)	1 (1.04)
Virus Sincitial Respiratorio	40 (37.73)	15 (15.63)
Parainfluenza virus 3	4 (3.77)	2 (2.08)
Influenza virus B	2 (1.88)	0 (0.0)
Adenovirus	0 (0.0)	1 (1.04)
Influenza virus A	0 (0.0)	0 (0.0)
Parainfluenza virus 1	0 (0.0)	0 (0.0)
Parainfluenza virus 2	0 (0.0)	0 (0.0)
Negativo	45 (42.45)	77 (80.21)

En las muestras de secreción nasofaríngea se detectó positividad viral en 61 de 106 muestras lo cual equivale al 57.57%, mientras que en las muestras de secreción nasal sólo hubo un 19.79% de positividad viral, es decir 19 de 96 muestras. En ambos casos, el RSV fue el virus más frecuente sin embargo cuando se usó secreción nasofaríngea la frecuencia de positividad fue 37.73% versus 15.63% cuando se usó hisopado nasal. También fue mucho más alta la positividad para HMPV cuando se evaluó en células de la nasofaringe (14,15%) comparada con la detección en células del epitelio nasal (1.04%). La temporalidad en la circulación de los virus no afectó la comparación entre las muestras tomadas, puesto que al evaluar solamente las muestras tomadas en los

misimos meses durante el 2016 y el 2017 (dato no mostrado), el resultado fue el mismo.

Para los demás virus respiratorios, aunque la positividad fue muy baja, no hubo diferencias en la frecuencia de detección entre los dos tipos de muestra, la mayoría estuvo consistentemente negativa. Cuando se compararon las muestras solamente del 2017, se obtuvo significativamente mayor positividad tanto para HMPV como para RSV en las muestras de secreción nasofaríngea. Los resultados indican que la técnica de obtención de la secreción respiratoria probablemente tiene un impacto importante en la estimación de la prevalencia de HMPV y RSV por IFA. La muestra de elección recomendada, según estos resultados, es la secreción nasofaríngea obtenida por succión. Por lo tanto, los resultados de muestras evaluadas retrospectivamente que fueron tomadas todas por hisopado nasal no se consideraron en el análisis para estimar la prevalencia de HMPV.

Gráfico 5 Células de muestras nasales y nasofaríngeas (40x)



Izquierda: muestra tomada de cavidad nasal con hisopo de madera con torunda de algodón, se observan células grandes con alta relación nucleocitoplasma señaladas con flechas blancas. *Derecha:* muestra tomada de nasofaringe por succión con sonda nasogástrica, se observan células pequeñas de baja relación nucleocitoplasma señaladas con flechas azules. Además se observan células con tinción verde manzana brillante y patrón moteado indicando células positivas a la infección por HMPV. Microscopio de epifluorescencia bajo objetivo de 40X, la línea roja inferior derecha indica 10μm.

6.3 Descripción las características clínicas, de severidad, desenlace clínico y ocurrencia de infecciones virales mixtas en niños menores de 2 años con IRA por HMPV

Se describen en la Tabla 5 los principales hallazgos clínicos, paraclínicos y radiológicos de los niños positivos a HMPV comparados con los niños positivos para RSV, el otro virus más frecuentemente asociado a IRA en lactantes, y otros diagnósticos virales.

Tabla 5. Características clínicas y de laboratorio según agente etiológico, n=106

Características	HMPV+ ¹	RSV+ ¹	Otros virus ²	Negativo ²
Frecuencia y descripción demográfica				
Frecuencia (n, %) [IC95%]	18 (16.98) ³ [11.15-26.56]	63 (59.43) ⁴ [50.41-69.74]	6 (5.66)	19 (17.92)
Edad en meses (mediana, min-max)	6 meses (1.33-23.37)	3 meses y 2 días (0.33-23.3)	2 meses y 5 días (0.97-15.77)	2 meses y 12 días (0.6-24)
Sexo masculino (n, %)	13 (72.22)	46 (73.02)	3 (50.0)	6 (31.58)
Paraclínicos⁵ (n, %)				
Recuento de leucocitos normal*	14 (77.78)	52 (82.54)	5 (83.33)	15 (78.95)
Recuento de neutrófilos normal	11 (61.11)	51 (80.95)	5 (83.33)	12 (63.16)
Recuento de linfocitos normal	6 (33.33)	41 (65.08)	4 (66.67)	12 (63.16)
- Recuento aumentado	6 (33.33)	5 (7.94)	1 (16.67)	1 (5.26)
Recuento de monocitos normal	7 (38.89)	22 (34.92)	0 (0.0)	8 (42.11)
- Recuento aumentado	9 (50.0)	31 (49.21)	6 (100.0)	10 (52.63)
Concentración de proteína C reactiva en mg/dL (mediana, min-max)	23 (0.2-116)	7.8 (0.3-150.8) ⁶	1.45 (0.2-74)	5.7 (0.2-192.3)
Hallazgos radiológicos⁷ (n, %)				
Radiografía normal	5 (27.78)	9 (14.29)	1 (16.67)	6 (31.58)
Opacidades sin consolidación	6 (33.33)	22 (34.92)	2 (33.33)	1 (5.26)
Atelectasia	2 (11.11)	4 (6.35)	1 (16.67)	1 (5.26)
Consolidación	1 (5.56)	7 (11.11)	1 (16.67)	1 (5.26)
Hiperaeración	2 (1.11)	6 (9.52)	1 (16.67)	3 (15.79)
Engrosamiento bronquial	1 (5.56)	1 (1.59)	0 (0.0)	2 (10.53)
Otros hallazgos ⁸	1 (5.56)	9 (14.29)	0 (0.0)	1 (5.26)
Auscultación (n, %)				
Normal	2 (11.11)	9 (14.29)	2 (33.33)	7 (36.84)
Estertores o roncus	8 (44.44)	21 (33.33)	2 (33.33)	7 (36.84)
Cualquier sibilancia, inspiratorias o espiratorias	8 (44.44)	33 (52.38)	2 (33.33)	5 (26.31)
Gravedad de la enfermedad (n, %)				
Leve	7 (38.89)	19 (30.16)	4 (66.67)	8 (42.11)
Moderada	9 (50.0)	28 (44.44)	2 (33.33)	11 (52.89)
Severa	2 (11.11)	16 (25.40)	0 (0.0)	0 (0.0)
Unidad de cuidados intensivos	2 (13.33)	23 (36.5)	0 (0.0)	2 (10.52)
Muerte	0 (0.0)	2 (3.17)	0 (0.0)	0 (0.0)
¹ Diagnóstico viral con IFA+RT-PCR en tiempo real. ² Diagnóstico viral sólo por IFA. ³ Una infección mixta de RSV con HMPV. ⁴ Una infección mixta de PIV-3 con RSV. ⁵ Un individuo en "grupo Negativo" sin paraclínicos reportados. ⁶ Un individuo en "grupo RSV+" sin resultado de proteína C reactiva. ⁷ Ocho individuos sin radiografía reportada, cuatro en "grupo RSV+" y cuatro en "grupo Negativo". ⁸ Otros hallazgos corresponden a combinaciones de los hallazgos más frecuentes así: atelectasia con engrosamiento bronquial, opacidades o consolidación; hiperaeración con engrosamiento bronquial; opacidades sin consolidación o consolidación. * Valores de referencia para hemograma descritos en el Anexo 2.				

La mediana de edad para los niños con HMPV+ fue 6 meses (rango entre 1 mes y 9 días – 23 meses y 11 días) mientras que en los otros tres grupos de clasificación se observó medianas de edad de 3 meses o menos. La mayoría de los niños con HMPV+ son de sexo masculino (72.22%) al igual que los niños con infección viral positiva para virus diferentes a HMPV. De los 15 niños positivos para HMPV en los que se conocía el antecedente de prematurez, tres niños (20%) fueron prematuros y de éstos dos fueron prematuros extremos (gestación menor a 32 semanas).

En los parámetros de laboratorio no se encontraron alteraciones en los recuentos leucocitarios de los niños con infección viral positiva, salvo en el recuento de monocitos. La alteración más frecuente en el hemograma fue monocitosis en más de la mitad de los individuos del estudio. Otro resultado paraclínico como la proteína C reactiva fue positivo en la mayoría de los niños con infección por HMPV con una mediana de concentración de 23 mg/dL (rango 0.2-116). En la valoración del sistema respiratorio, la mayoría de los individuos de todos los grupos presentaron alguna alteración en el murmullo vesicular normal. En el grupo de HMPV+ se detectaron los siguientes ruidos sobreagregados: roncus o estertores en 8 niños (44.44%) y sibilancias (cualquier sibilancia, sibilancias inspiratorias o espiratorias) en 8 niños (44.44%), resultado similar en el grupo de RSV y otros virus excepto en el grupo negativo para todos los virus donde la frecuencia de sibilancias fue menor (26.31%). En la mayoría de niños se encontró alguna alteración en la imagen pulmonar siendo el resultado más frecuente las opacidades sin consolidación, alteración característica en bronquiolitis. Clínicamente se clasificó la severidad de la enfermedad utilizando la escala descrita inicialmente por Tal *et al*⁹⁷ y posteriormente modificada⁹⁸⁻¹⁰¹ (ver en Anexo 4) la cual evalúa la auscultación, uso de músculos accesorios, frecuencia respiratoria, saturación de oxígeno con o sin oxígeno suplementado y condición general del niño. De acuerdo a los resultados de este estudio, el 50% de los niños con HMPV+ tuvieron una gravedad moderada de la enfermedad. Sin embargo, la mayor frecuencia de gravedad severa de la enfermedad se presentó en el grupo RSV+, donde 16 niños (25.40%) presentaron el grado más alto de severidad para la enfermedad. En el grupo HMPV+ sólo dos niños (11.11%) tuvieron una enfermedad severa.

Durante este estudio se presentaron dos muertes asociadas a IRA, ambas en el grupo de infección positiva única para RSV, una niña y un niño ambos de un mes y medio de edad. Los niños estuvieron hospitalizados en UCI pediátrica donde debido a complicaciones inherentes a la enfermedad respiratoria y fallecieron luego de 7 y 8 días respectivamente. Sólo se conocía el antecedente perinatal de uno ellos quien presentó prematuridad extrema (nacimiento a las 29 semanas de gestación) y bajo peso al nacer (1450g); no se conocen los antecedentes del otro niño salvo que venía remitido de un resguardo indígena del departamento del Cauca.

6.3.1 *Baja frecuencia de infecciones virales mixtas*

Se determinaron dos infecciones virales mixtas, ambas involucrando a RSV. El primer caso se trata de una niña de raza negra de 1 mes y 13 días, en su primer episodio respiratorio con once días de evolución de los síntomas. Los paraclínicos muestran leucopenia con monocitosis y proteína C reactiva negativa ($<0.2\text{mg/dL}$). A la imagen radiológica opacidades sin consolidación. El diagnóstico de laboratorio fue RSV por IFA, luego en el RT-PCR en tiempo real se detectó simultáneamente HMPV (CT=21.78 y CT=34.68 respectivamente). El segundo caso se trata de un niño de raza mestiza de 1 mes y 20 días, con cinco días de evolución y antecedente de prematuridad tardía (36 semanas de gestación). Los paraclínicos muestran un hemograma con leucopenia y proteína C reactiva positiva (55mg/dL). El diagnóstico por laboratorio fue PIV-3 por IFA, luego en el RT-PCR en tiempo real se detectó RSV (CT=32.61). Ambos niños tuvieron un diagnóstico clínico de bronquiolitis con severidad de la enfermedad moderada (RSV+HMPV) y leve (RSV+PIV-3), sin complicaciones en la resolución del cuadro viral.

Debido a la baja frecuencia viral por subgrupo, de infecciones virales mixtas y el carácter exploratorio del estudio solamente se presentan de forma descriptiva.

6.4 Evaluación del desempeño diagnóstico de la RT-PCR en tiempo real

A continuación presentan los resultados de la evaluación del desempeño diagnóstico entre la RT-PCR en tiempo real y la IFA directa al detectar una infección positiva por HMPV. Adicionalmente se evalúan los mismos parámetros para RSV dado que la

prueba molecular es un dúplex RSV/HMPV (ver subcapítulo 5.6.3, página 42). En ambos casos se toma la IFA como estándar de oro o prueba de referencia.

Se realizó RT-PCR en tiempo real a las 106 muestras de pacientes incluidos en el estudio. Se detectaron 18 muestras positivas para HMPV, 63 para RSV y una muestra con infección mixta para ambos virus. En 24 muestras (22.64%) no se detectó HMPV ni RSV.

6.4.1 Diagnóstico molecular de HMPV por la prueba RT-PCR en tiempo real

En la Tabla 6 se describe la positividad de las muestras para HMPV de acuerdo a la técnica de detección utilizada:

Tabla 6 Detección de HMPV por IFA versus RT-PCR en tiempo real (n, %)

RT-PCR para HMPV	IFA para HMPV		Total
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	14 (93.33)	4 (4.40)	18 (16.98)
Negativo	1 (6.67)	87 (95.60)	88 (83.02)
TOTAL	15 (14.15)	91 (85.85)	106 (100.0)

El diagnóstico molecular de HMPV comparado con el diagnóstico por IFA detectó 14 muestras positivas y 87 muestras negativas para ambas pruebas. Cuatro muestras fueron positivas por el RT-PCR en tiempo real pero negativas por IFA, mientras que una sola muestra fue positiva por IFA y negativa por el RT-PCR en tiempo real. En total, la prueba molecular detectó 18 muestras positivas versus 15 muestras que detectó la IFA. De todas las muestras analizadas, 88 fueron negativas por la prueba molecular versus 91 por IFA.

Lo anterior, permitió estimar los parámetros de desempeño diagnóstico para el RT-PCR de HMPV que se describen a continuación. La sensibilidad calculada fue $S=93.33\%$ (IC95%: 70.18% - 98.81%), lo cual quiere decir que de cada 100 veces que se realice el RT-PCR en tiempo real, 93 de las veces se detectará correctamente a los

individuos con infección positiva para HMPV, sin embargo con una confianza del 95% la sensibilidad de esta prueba estará entre 70% y 99% aproximadamente. La especificidad calculada fue E=95.6% (IC95%: 89.24% - 98.28%) lo cual indica que 95% de los niños sin infección por HMPV confirmados por IFA también tienen un resultado negativo en la RT-PCR en tiempo real. Con respecto a los valores predictivos positivo y negativo, los cuales indican la probabilidad de que el test estándar de oro (IFA) sea positivo dado que el test (RT-PCR en tiempo real) es positivo y que el estándar de oro sea negativo dado que el test es negativo, respectivamente, se encontró que de 100 niños con HMPV el RT-PCR en tiempo real detecta 78 (VPP=77.78%, IC95%: 54.78% - 91%). Y, de 100 niños sin HMPV el test lo indica así en 99 de ellos (VPN=98.86%, IC95%: 93.84% - 99.8%).

Además, se estimó la concordancia entre las pruebas RT-PCR en tiempo real e IFA mediante el índice Kappa que fue 0.8206 (IC95% 0.6316 - 1.01) que de acuerdo a la escala Landis y Koch es una concordancia entre ambas pruebas “casi perfecta” (ver Anexo 6). Es decir que por cada 100 veces que se realice la comparación de diagnóstico para HMPV entre la RT-PCR en tiempo real e IFA, 95 de esas veces se va a obtener una concordancia entre considerable y casi perfecta.

Cinco muestras fueron discordantes entre las pruebas evaluadas (ver detalle en Anexo 7) una muestra positiva por IFA pero negativa por RT-PCR en tiempo real y cuatro muestras negativas por IFA pero positivas por RT-PCR en tiempo real. Dichos resultados pueden ser explicados de acuerdo al ciclo umbral de detección [Threshold Cycle (CT)] de la prueba molecular, que es un indicador de la cantidad de virus en la muestra. El CT es el número del ciclo de amplificación en el cual la fluorescencia generada por la reacción de PCR es superior a la fluorescencia de base y es una medida de concentración relativa de la cantidad de DNA blanco (en este caso el virus) en la muestra. La relación entre CT y la cantidad de DNA es inversamente proporcional, es decir que a menor CT mayor es la concentración de virus en la muestra y por el contrario a mayor CT menor es la concentración de virus que se tiene en la muestra. La muestra positiva por IFA y negativa por RT-PCR en tiempo real (IFA+PCR-) no tuvo CT detectable por RT-PCR en tiempo real. Mientras que las cuatro muestras que fueron positivas sólo por la prueba molecular (IFA-PCR+) tuvieron un CT

de 20.63, 34.61, 34.68 y 38.79 cada una. Para determinar si la concentración de virus (a juzgar por el valor CT) podría explicar la discordancia en los resultados de la IFA e RT-PCR en tiempo real se realizó el análisis de los valores CT de todas las muestras concordantes entre la IFA y RT-PCR en tiempo real (n=14) y todas las discordantes con la IFA (n=5) para un total de 19 muestras, como se detalla en la Tabla 7. Se excluyen de éste análisis los resultados negativos para ambas pruebas.

Tabla 7. Comparación de valor CT del RT-PCR en tiempo real en muestras discordantes con la IFA para HMPV (n=19)

	Muestras Concordantes (n=14)	Muestras Discordantes (n=5)*
Valor CT del RT-PCR para HMPV+ (mediana, min-máx)	24.36 (17.39-28.68)	34.65 (20.63-38.79)

* Cuatro muestras positivas sólo por RT-PCR y una muestra positiva sólo por IFA

Para el análisis anterior se consideran dos grupos de muestras con resultados concordantes o discordantes entre la RT-PCR en tiempo real y la IFA. Las muestras concordantes tuvieron más bajos valores CT (mediana=24.36; min: 17.39; máx: 28.68), que las muestras discordantes (mediana=34.65; min: 20.63; máx: 38.79), indicando que habían niveles mayores de virus en las muestras concordantes por ambas técnicas. Mientras que las muestras discordantes que fueron detectadas por la prueba molecular, pero no por IFA, tenían menor concentración de virus. Lo anterior sugiere que el RT-PCR posiblemente tiene mejor sensibilidad de detección que la IFA (Anexo 7) y eso explicaría los falsos positivos al compararlo con la IFA como estándar de oro.

6.4.2 Diagnóstico molecular de RSV por la prueba RT-PCR en tiempo real

El diagnóstico molecular de RSV comparado con el diagnóstico por IFA detectó 40 muestras positivas y 42 muestras negativas para ambas pruebas como se describe en la Tabla 8.

Tabla 8 Detección de RSV por IFA versus RT-PCR en tiempo real (n, %)

RT-PCR para RSV	IFA para RSV		Total
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	40 (62.50)	24 (36.36)	64 (60.38)
Negativo	0 (0.0)	42 (63.64)	42 (39.62)
TOTAL	40 (37.74)	66 (62.66)	106 (100,0)

En total, la prueba molecular detectó 64 muestras positivas mientras que la IFA detectó 40. Mediante la prueba molecular 42 muestras fueron consideradas negativas y por IFA 66 muestras. Con base en estos resultados se calcularon los siguientes parámetros de desempeño diagnóstico para la RT-PCR en tiempo real de RSV: la sensibilidad fue del 100% (S=100.00%, IC95%:91.24 – 100) y la especificidad 63.64% (E=63.64%, IC95%: 51.58 - 74.19). Los valores predictivos positivos y negativos fueron 62.5% y 100% respectivamente (VPP=62.50%, IC95%:50.25-73.33 y VPN=100%%, IC95%: 91.62-100).

La concordancia determinada fue índice Kappa igual a 0.5691 (IC95%: 0.3973 - 0.7409) lo cual indica una concordancia moderada entre ambas pruebas según la escala de Landis y Koch ¹⁰². Veinticuatro muestras fueron IFA-PCR+ y ninguna muestra IFA+ fue PCR- (ver detalle en Anexo 8). Al igual que para HMPV la discordancia entre la prueba molecular de RSV y la IFA se detalla a continuación en la Tabla 9. Se excluyen de éste análisis los resultados negativos para ambas pruebas.

Tabla 9. Comparación de valor CT del RT-PCR en tiempo real en muestras discordantes con la IFA para RSV, (n=64)

	Muestras Concordantes (n=40)	Muestras Discordantes (n=24)*
Valor CT del RT-PCR para RSV (mediana, min-máx)	20.645 (15.21-25.84)	27.6 (20.25-35.44)

* Muestras positivas sólo por RT-PCR en tiempo real.

Las muestras con resultados concordantes tuvieron un valor CT entre 15.21 y 25.84 con una mediana de 20.64, mientras que las muestras discordantes tuvieron valor CT entre 20.25 y 35.44 con una mediana de 27.6. Lo anterior, al igual que con HMPV sugiere que la discordancia entre las pruebas podría ser debido a la cantidad relativa de virus en las muestras. La RT-PCR de RSV detecta valores tan bajos como $LoD_{95\%}=2.0$ TCID₅₀/mL mientras que la IFA al ser una prueba cualitativa requiere de una célula infectada por campo en un objetivo de 40x para detectar positividad. Una sola célula positiva en *toda* la muestra (la cual es indetectable por IFA) podría contener miles de copias del virus que *sí* son detectables por el RT-PCR. En el Anexo 8 se detallan las muestras negativas por IFA pero positivas por el RT-PCR, la mitad de las muestras (14 de 24) tuvieron un valor CT mayor a 27 y una cuarta parte de ellas (7 de 24) tuvieron un CT mayor a 30. Por lo tanto, el RT-PCR de RSV posiblemente tiene mejor sensibilidad de detección que la IFA y eso explicaría los falsos positivos al compararlo con la IFA como estándar de oro

Los días desde inicio de síntomas al diagnóstico entre resultados discordantes y concordantes fueron similares para HMPV y RSV. En individuos con infección por HMPV la mediana de días fue 4 y 4.5 y para RSV fueron 5 y 6 días en los grupos de resultados concordantes y discordantes respectivamente.

7 Discusión

Los hallazgos en este trabajo de investigación confirman que el HMPV es agente etiológico de IRA en niños menores de dos años (lactantes) que consultan al servicio de urgencias en un hospital de tercer nivel en Cali. La prevalencia determinada para HMPV (16.98%; IC95%: 11.15-26.56%) en lactantes resultó ser 4.69 veces mayor a la frecuencia estimada previamente para todos los grupos de edad en Colombia entre 2000-2011⁵. Los hallazgos en el presente estudio son información nueva sobre la co-circulación de HMPV y RSV en lactantes colombianos.

Un resultado novedoso fue encontrar al HMPV como el segundo virus más prevalente después de RSV asociado a episodios de IRA en lactantes. A nivel mundial se ha establecido que virtualmente a la edad de cinco años todos los niños tendrán anticuerpos contra el HMPV indicando así que han tenido contacto previo con el virus³, sin embargo en Colombia pocos son los estudios publicados sobre la frecuencia y seroprevalencia de virus respiratorios a nivel nacional¹⁰⁴⁻¹⁰⁸ incluyendo la vigilancia en salud pública realizada por el INS^{5,109}. Tradicionalmente RSV ha sido el principal virus implicado en IRA; en el 2005 se estimó que la carga de morbilidad ocasionada por RSV a nivel mundial fue aproximadamente 33 millones (IC95%:19.3 - 46.2) de nuevas infecciones y 3.4 millones (IC95%: 2.8 - 4.3) de hospitalizaciones por IRA severa en niños menores de cinco años (6 de cada 1000 niños menores de un año)¹¹. Sin embargo, para HMPV sólo se ha publicado un estudio estimando la carga de enfermedad en población pediátrica general de USA en el cual 55 de cada 1000 (IC95%:46-66) niños menores de cinco años consultaron al médico pero sólo 1 por cada 1000 niños requirió hospitalización⁶¹. Al comparar entre menores de cinco años, la tasa de hospitalización de HMPV resultó ser similar a las tasas de Influenza virus (1 por cada 1000)¹¹⁰ y Parainfluenza virus (1 por cada 1000)¹¹¹, aunque tres veces menor que la tasa de RSV (3 por cada 1000)¹¹², estas incidencias fueron establecidas de acuerdo a estudios en tres condados de USA (Cincinnati, Nashville, y Rochester, New York) en el marco de *The New Vaccine Surveillance Network* (NVSN) organización establecida por el CDC desde 1999; estos datos no son necesariamente

representativos para las regiones tropicales y países en vía de desarrollo como Colombia. Los hallazgos del presente estudio contribuyen al conocimiento de la enfermedad por HMPV en el contexto de nuestro país y su prevalencia entre niños menores de dos años.

Una contribución importante de este estudio es la evidencia epidemiológica para incluir al HMPV como parte del diagnóstico clínico de rutina en los pacientes con IRA de fenotipo viral y como diagnóstico diferencial de las bronquiolitis en lactantes en Cali, particularmente en el Hospital Universitario del Valle. De manera importante, se confirmó que la prueba de IFA para HMPV tiene un desempeño diagnóstico similar a una prueba molecular de mayor costo. Así mismo, un beneficio adicional fue el acceso al diagnóstico de virus respiratorios de importancia clínica para al menos 200 lactantes que consultaron la sala de urgencias pediátricas del HUV, quienes tuvieron la oportunidad de un diagnóstico temprano. Por lo cual se realizó un importante aporte a la salud pública local para la ciudad y la institución hospitalaria participante. El INS detalla en su protocolo de vigilancia para infecciones respiratorias²⁰, acciones individuales y colectivas que promuevan actividades como la inmunización preventiva ante la infección por virus de la influenza, el uso profiláctico de Palivizumab en prematuros extremos, la notificación de casos por parte de los UPGD, búsqueda activa comunitaria, entre otros para prevenir, diagnosticar y vigilar las IRA. Aunque algunas guías internacionales sobre el manejo de bronquiolitis no apoyan el diagnóstico viral de rutina para las IRA^{42,113}, otros grupos de expertos soportan el requerimiento de diagnóstico viral de rutina en IRA¹¹⁴.

A pesar de que no existe un consenso o guía nacional sobre los virus respiratorios a evaluar de rutina ante la sospecha clínica de un episodio de IRA, la principal utilidad del diagnóstico clínico de virus respiratorios es el beneficio integral del paciente en términos de: i) la correcta clasificación e aislamiento de pacientes y personal de salud infectados para minimizar el riesgo de transmisión a pacientes más susceptibles (hasta 71% de transmisión viral entre las 2 a 4 horas luego del contacto con un niño infectado con RSV¹¹⁵), ii) control en el uso indiscriminado de antibióticos, iii) el uso de terapias antivirales preventivas disponibles a los pacientes que lo requieran como el Palivizumab para RSV y la vacuna para Influenza virus y iv) para la comunidad:

estableciendo indicadores de vigilancia virológica de interés nacional en salud pública, realizando la identificación de virus emergentes y reemergentes y estableciendo las tendencias epidemiológicas virales del sector ^{114,116}. Si bien la baja frecuencia de muestras negativas en este estudio sugiere un alto acierto en el criterio clínico (sólo 19 muestras de 106 fueron negativas para los virus evaluados) sigue siendo necesaria la confirmación por laboratorio de la sospecha clínica por las razones mencionadas anteriormente.

Este estudio demuestra que en lactantes hospitalizados por IRA de sospecha viral, RSV y HMPV explican el 80% de la etiología. Realizar un diagnóstico diferencial entre estos dos virus principales responsables de las bronquiolitis y neumonías graves podría contribuir a la optimización de recursos del sistema de salud y disminuir el impacto de la morbilidad por IRA. El diagnóstico diferencial entre RSV y HMPV es importante para la estimación de la carga de enfermedad y probablemente para la toma de decisiones en salud pública apropiadas para nuestro entorno, tales como la identificación de población blanco para prevención con futuras vacunas o indicación de esquema de profilaxis con Palivizumab. Estudios previos indican que la interferencia epidemiológica (inmunológica y no inmunológica) dada por la co-circulación de patógenos en la misma población puede tener potencialmente importantes consecuencias en el diseño de un esquema de inmunización efectivo ¹¹⁷, una de las principales razones es la carga de enfermedad dada por el agente etiológico, es decir, que parte de la efectividad de la vacuna en proteger contra una enfermedad está dada en que dicha vacuna esté dirigida contra los microorganismos más prevalentes en dicha enfermedad y de ahí la necesidad de vacunas polivalentes. Un estudio colaborativo entre investigadores del *Center for Infectious Disease Dynamics* de la Universidad estatal de Pensilvania y el departamento de matemáticas de la Universidad de Utah en USA describieron como una posible inmunidad cruzada protectora temporal entre RSV, Parainfluenza virus y HMPV podría explicar la temporalidad de circulación de cada virus en una ventana de observación de 14 años (2000-2014) ¹¹⁸. Sin embargo, el desarrollo de vacunas exitosas no ha sido posible debido a que estos virus no generan una inmunidad a largo plazo, incluso luego de la infección natural y esto explica la alta tasa de reinfecciones durante la vida.

Aunque al presente se han desarrollado estrategias vacunales para estos dos virus que son potenciales candidatos para ser comercializados como vacuna alrededor del mundo ^{83,84}, el único tratamiento profiláctico aprobado para su uso en niños es el Palivizumab, efectivo sólo para RSV; se trata de un anticuerpo monoclonal humanizado (fragmento Fab de ratón y fracción Fc de humano) que confiere inmunidad pasiva contra el RSV reduciendo los días de estancia hospitalaria pero no evita la infección ni previene mortandad. En Colombia, Palivizumab (15mg/kg) está indicado para la prevención de IRA grave del tracto respiratorio inferior que requiere hospitalización producida por RSV en: niños nacidos a las 32 semanas o menos de gestación y que tienen menos de 6 meses de edad en el inicio de la estación RSV y niños menores de 2 años que hayan requerido tratamiento de la displasia broncopulmonar durante los últimos seis meses; pero en niños con cardiopatía congénita hemodinámicamente significativa aún no hay un consenso ¹¹⁹. Sin embargo su uso en nuestro medio sigue siendo controversial, un estudio en 2013 evaluó la costo-efectividad del uso profiláctico del Palivizumab en niños colombianos prematuros de 32 semanas o menos concluyendo que Palivizumab no es costo-efectivo en nuestro medio (\$53.121.137 de pesos colombianos por cada año de vida ganado) y para que lo sea debe disminuir su costo dos terceras partes de su precio actual (en 2013: \$25.831 pesos por gramo) ¹²⁰. Con los resultados preliminares de este estudio que reportan el HMPV como segunda causa de hospitalización por IRA grave en lactantes en Colombia, se hace necesario evaluar su impacto en las IRA grave en niños con historia de prematuridad. Lo anterior permitiría un mejor manejo y de manera importante la optimización de uso del Palivizumab efectivo solamente en RSV.

Con respecto a las características demográficas y clínicas observadas en este estudio, la infección por HMPV parece ocurrir a mayor edad, 6 meses de edad, mientras que la infección con RSV ocurre a más temprana edad, 3.07 meses de edad, coincidiendo con lo descrito para la infección HMPV comparativamente con RSV ^{121,122}. Las características clínicas observadas en niños con infección viral positiva fueron similares y corresponden a sintomatología de vías respiratorias inferiores y síndrome de dificultad respiratoria leve a moderado asociado a tos y congestión nasal. En un reporte de casos del 2012 ⁴, el primero sobre HMPV en Colombia se describen seis niños hospitalizados en el Hospital Pablo Tobón Uribe de Medellín con infección positiva para

HMPV, se refieren como características clínicas importantes la acentuada hipoxia que presentaron algunos de pacientes evidenciada en necesidad de oxígeno durante la enfermedad con indicación de compromiso intersticial. Las edades de estos niños fueron entre los once meses y nueve años. El diagnóstico de laboratorio fue realizado por cultivo en tres líneas celulares diferentes y posteriormente confirmado por IFA y PCR. Para estos seis casos, la recuperación fue completa, utilizando únicamente medidas de soporte. Aunque las características clínicas entre infecciones virales son indistinguibles de acuerdo a su etiología ¹²³, el espectro de manifestaciones clínicas descritas para HPMV varía entre síntomas de vías respiratorias altas hasta cuadros severos de bronquiolitis y neumonía. Los hallazgos de este estudio describen una alta frecuencia de síntomas respiratorios bajos y diagnóstico clínico de bronquiolitis en el 50.0% de los pacientes con HMPV y neumonía en el 38.89%, hallazgos similares al estudio español de García-García *et al* ¹²⁴. La mitad de las IRA causadas por HMPV fueron clasificadas como grado moderado (50.0%) de enfermedad y sólo el 11.1% de los casos fueron severos. En general RSV parece causar una enfermedad más severa que HMPV con 25.4% vs 11.1% de casos severos y 36.5% vs 13.33% de traslados a la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) por RSV y HMPV respectivamente. Si bien RSV tiene más estrategias de evasión inmune, como las proteínas NS1 y NS2 ausentes en HMPV y una inducción de respuesta inmunológica inflamatoria tipo Th2 ^{125,126}, se han reportado casos muy severos de infecciones por HMPV asociadas al sistema nervioso central involucrando episodios de epilepsia y encefalitis ^{78,127,128}. En el presente estudio siete niños tuvieron algún episodio de convulsión durante su estadía hospitalaria bajo el tratamiento para la IRA, cinco de ellos fueron positivos para RSV y ninguno de ellos fue positivo para HMPV. En ninguno de los casos fue el primer episodio convulsivo y en la mayoría el grado de enfermedad por IRA fue leve. Hubo dos muertes asociadas a IRA, ambos con infección positiva por RSV y con factores de riesgo socioeconómico como desnutrición, demora en la oportunidad de consulta médica, prematurez y bajo peso al nacer. No se presentaron muertes asociadas a infección por HMPV. Además, sólo el 1.88% de las infecciones detectadas fueron mixtas (n=2) contrario a otros estudios donde se han confirmado tasas de infecciones mixtas entre HMPV y RSV desde 10 hasta 72% principalmente en niños hospitalizados en UCI ⁸¹. Un estudio español reciente que involucró 1041 menores de 14 años hospitalizados por IRA, detectó 38% de co-infecciones entre HMPV y otros virus principalmente: rinovirus

(41.5%) y enterovirus (33.8%), siendo la co-infección con RSV (16.9%), PIV (13.8%) y bocavirus (12.3%) las de menor frecuencia ⁷⁰. En nuestro estudio las co-infecciones se dieron entre RSV+HMPV y RSV+PIV-3.

Algunos estudios afirman que factores como las co-infecciones y el genotipo viral influyen sobre la severidad de la enfermedad ¹²⁹, en el nuestro un bajo porcentaje de IRA fue considerado de gravedad severa lo cual puede estar relacionado con la baja frecuencia de infecciones virales mixtas aunque no se haya determinado el genotipo viral circulante. Sin embargo otros factores como la una alta carga viral parecen estar más relacionados con sintomatología de vías respiratorias bajas y mayor severidad en la enfermedad que las co-infecciones y los genotipos virales ¹²⁸. Aunque es un tema controversial ya que recientemente un estudio evaluó la interdependencia entre la carga viral, la respuesta inmune innata y la clínica de la enfermedad por RSV concluyendo que una alta carga viral al inicio de la enfermedad puede estimular más eficientemente la respuesta inmune innata resultando en una rápida resolución de la enfermedad¹³⁰. Así mismo se ha reportado que la infección por RSV puede generar inmunidad protectora (*cross-protective immunity*) para PIV1-3 y HMPV, aunque no se pudo demostrar su efecto recíproco para RSV¹¹⁸.

Entre los hallazgos paraclínicos más del 70% de los niños del estudio tuvieron un recuento de leucocitos normal con algunas alteraciones en el recuento de mononucleares. Se encontró una marcada monocitosis en el 50.0% de los niños con HMPV y valores similares en los demás niños del estudio. Linfopenia sólo ocurrió en un tercio de los niños con HMPV (33.33%), en el 26.98% y 16.67% de los niños con RSV y otros virus respectivamente. Ambos resultados de linfopenia y monocitosis se han reportado para las infecciones respiratorias agudas de virus diferentes a Influenza como HMPV y RSV ^{131,132}. Otro parámetro paraclínico como la concentración de proteína C reactiva fue ligeramente mayor en el grupo HMPV+ frente a los otros tres grupos de niños (23.0, 7.8, 1.45 y 5.7, HMPV+, RSV+, otros virus y negativo respectivamente). Aunque su uso en la práctica clínica es orientado al pronóstico de los pacientes y en el caso de las infecciones respiratorias para diferenciar la etiología bacteriana de la viral, donde en la primera el proceso inflamatorio es mayor y por tanto

la concentración de proteína C reactiva es muy alto comparado con las infecciones virales.

Los resultados de este estudio muestran claramente diferencias en las frecuencias estimadas de HMPV y RSV de acuerdo al tipo de muestra evaluada. Se encontró que la positividad viral para RSV y HMPV es menor en las muestras de secreción nasal tomadas con hisopo que en las muestras nasofaríngeas tomadas por aspirado (ver Tabla 4). Aunque algunos estudios han indicado que no existen diferencias entre la muestra nasal y nasofaríngea ¹³³⁻¹³⁵, otros si sugieren que hay diferencias en la positividad viral de acuerdo al tipo de muestra comparando diferentes técnicas de detección viral como IFA, PCR y cultivo ^{136,137}. Las diferencias en las frecuencias virales entre tipos de muestras se han reportado principalmente para Influenza virus y RSV sugiriendo que la detección de RSV por IFA en muestras de secreción nasofaríngea es mucho más sensible que en muestras nasal, lo cual coincide con los hallazgos de este estudio, mientras que lo contrario ocurre para Influenza virus ¹³⁸. Sin embargo si se utiliza PCR para la detección viral ambas muestras son igual de sensibles, lo cual no fue evaluado por nuestro estudio. Las principales diferencias entre ambas muestras son el tipo de células evaluadas, aunque el epitelio nasal y de la nasofaringe están recubiertos por el mismo epitelio cilíndrico ciliado pseudoestratificado (epitelio respiratorio), al tomar la muestra con hisopo de madera y torunda de algodón se alcanza el vestíbulo y no la región posterior de la cavidad nasal lo cual se observa al microscopio como células grandes aplanadas (escamosas) con una alta relación nucleo:citoplasma (1:4 a 1:5), por el contrario en la muestra de aspirado nasofaríngeo se observan células pequeñas de base ancha y extremo apical angosto con una relación nucleo:citoplasma baja (1:1 a 1:2) morfología típica del epitelio respiratorio (ver en Gráfico 5). Por tanto la muestra tomada con hisopo no es representativa del epitelio respiratorio sino de células del vestíbulo nasal cuyo epitelio está en constante recambio como medida física de protección, además el hisopo al tener una superficie absorbente (torunda de algodón) no permite una buena recuperación de células pues quedan atrapadas en la matriz de algodón disminuyendo la posibilidad de detectarlas en la IFA. Por el contrario la muestra nasofaríngea tomada por succión conserva la integridad celular al estar en contacto directo con una matriz lisa y de la cual fácilmente se pueden recuperar todas las células tomadas en la muestra. Los hallazgos de este

estudio sugieren utilizar muestras de secreción respiratoria tomadas por aspirado y no por hisopado con algodón para la detección viral por IFA. En caso de utilizar hisopado para la detección de virus por IFA, se prefieren los hisopos con mango de aluminio o plástico flexible y punta de poliéster, dacrón, rayón o nylon, ya que son más delgados y maleables adaptándose a la anatomía de la cavidad nasal para alcanzar la nasofaringe, además los materiales de la punta permiten un barrido suave del epitelio respiratorio para la obtención de células sin absorberlas dentro de la matriz del mismo o interferir en las pruebas de detección ¹³⁵. No se recomiendan los hisopos de punta de algodón o de alginato de calcio ya que las fibras de estos materiales pueden causar interferencias en la lectura de la IFA²⁰. Sin embargo, al utilizar PCR como la técnica de detección algunos estudios han encontrado igual sensibilidad al tomar la muestra con hisopo o mediante aspirado, y en este caso se prefiere utilizar los hisopos de punta de algodón secos conservados a temperatura ambiente para una mayor recuperación de RNA viral ¹³⁹.

Este estudio realizó una comparación de la detección molecular de HMPV y RSV con la detección por IFA (Tabla 6 y Tabla 8), porque esta última continúa siendo la prueba de elección para el diagnóstico de rutina por su rapidez y bajo costo en comparación con técnicas moleculares. Los hallazgos en este estudio, muestran que para HMPV el desempeño diagnóstico de la RT-PCR en tiempo real fue muy bueno, con una concordancia casi perfecta entre la RT-PCR en tiempo real y la IFA con un índice kappa=0.8208. Los valores de sensibilidad y especificidad de la RT-PCR en tiempo real están por encima del 90.0% (S=93.33%, E=95.6%) y los valores predictivos positivos y negativos fueron superiores al 70% (VPP=77.78%, VPN=98.86%). El LoD95% de la prueba molecular es $3.1 \log \text{DI}_{50}/\text{mL}$ ($20.4 \times 10^2 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$) y $3.7 \log \text{DI}_{50}/\text{mL}$ ($44.7 \times 10^2 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$) para HMPV-A y HMPV-B respectivamente y para la IFA es $4.0 \times 10^2 \text{ PFU}/\text{mL}$, $1.0 \times 10^2 \text{ PFU}/\text{mL}$, $6.25 \times 10^2 \text{ PFU}/\text{mL}$ y $2.75 \times 10^2 \text{ PFU}/\text{mL}$ para HMPV-A1, HMPV-A2, HMPVB-B1 y MPV-B2 respectivamente. Similares resultados se han obtenido en otros estudios, donde el LoD de HMPV-A ha sido $10^3 \text{ copias}/\text{mL}$ y para HMPV-B $10^4 \text{ copias}/\text{mL}$ ¹⁴⁰. Asumiendo una distribución Poisson¹⁴¹ puede estimarse que el LoD de IFA en términos de $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ es aproximadamente $2.8 \times 10^2 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$ para HMPV-A1, teóricamente 10 veces menor que el reportado para la prueba molecular ($20.4 \times 10^2 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$). Sin embargo el desempeño diagnóstico de la prueba

molecular se mide en términos cualitativos dicotómicos pues se evalúa un resultado positivo o negativo. Con lo cual los parámetros de desempeño evaluados como la sensibilidad, especificidad y VPP, VPN son muy buenos dado que la concordancia entre las pruebas fue casi perfecta¹⁰² y permiten estimar que la prueba diagnóstica cualitativa tiene un buen desempeño diagnóstico¹⁴². Lo anterior sugiere que para la detección de HMPV la prueba molecular y la IFA son igual de útiles en la oportunidad diagnóstica que ofrecen, y para el diagnóstico de rutina se podría utilizar indistintamente una u otra prueba, lo cual también ha sido sugerido por otros investigadores¹⁴³. Paralelamente, en el caso de RSV los parámetros de desempeño diagnóstico de la RT-PCR en tiempo real comparada con la IFA arrojaron un alto número de muestras clasificadas como falsos positivos. Al realizar el análisis estadístico de concordancia entre la prueba molecular y la IFA se obtuvo un índice kappa=0.5691 que según la escala de interpretación revela una concordancia “moderada”. Este estudio analizó la prueba molecular comparada con la IFA como estándar de oro (prueba de referencia). Sin embargo la sensibilidad de la prueba molecular para RSV (kit diagnóstico que ha sido usada como estándar de oro en evaluaciones por otros estudios) fue mayor que la prueba de referencia lo cual se enmascara en los valores de especificidad y valor predictivo negativo del RT-PCR en tiempo real, como falsos positivos, dado que el test diagnóstico superó la sensibilidad de la prueba de referencia. La IFA detectó como positivas para RSV un total de 40 muestras mientras que el RT-PCR en tiempo real detectó 64, un 37.5% más de muestras positivas para RSV que no fueron detectadas por la IFA. El LoD95% de la prueba molecular para RSV (subtipo A) es de 2.0 TCID₅₀/mL pero para la IFA no se especifica en el inserto del estuche comercial⁹⁵. Estudios como el de Reis *et al* en Brasil utilizaron el RT-PCR como prueba de referencia para evaluar la IFA reportando una S=69.4% y E=99.7%¹⁴⁴ resultados contrarios a los nuestros pero que serían similares a los del presente estudios si hubiésemos usado el RT-PCR en tiempo real como referencia (S= 62.5%, IC95%:50.25-73.33; E=100%; IC95%:91.62-100; VPP=100%; IC95%: 91.24-100; VPN= 63.64%, IC95%:51.58-74.19). Sin embargo el propósito de nuestro estudio fue estimar el desempeño diagnóstico del RT-PCR como la nueva prueba y era necesario utilizar la IFA como prueba de referencia. Contrario a todos los resultados anteriores algunos estudios reportan una buena concordancia entre ambas pruebas con valores aproximados de S=94.12% y E=97.95% también

utilizando el PCR como referencia¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Algunos investigadores consideran que los estudios financiados por las mismas casas comerciales que venden los estuches diagnósticos pueden suponer un conflicto de interés para la estimación de los parámetros de desempeño diagnóstico de dichos estuches diagnósticos. Los hallazgos en el presente estudio sugieren que para RSV es mejor realizar la prueba molecular ya que supera la sensibilidad de la IFA. Siendo la IFA una prueba de tamizaje se esperaría que su sensibilidad fuese más alta que su especificidad, toda vez que esto permite detectar todos los posibles positivos para luego ser corroborados mediante una prueba de alta especificidad o prueba confirmatoria, aun así se debe considerar un análisis de costo-efectividad entre las pruebas de IFA y RT-PCR en tiempo real antes de su implementación en el diagnóstico de rutina. En general debido a su alta sensibilidad, las pruebas moleculares se recomiendan a como pruebas de referencia en todos los campos de la microbiología^{148,149}. En el caso de HMPV fueron las nuevas técnicas moleculares combinadas con las técnicas de aislamiento viral tradicionales que permitieron su descubrimiento en 2001. A partir de aislados virales en cultivos celulares no identificados que se realizó amplificación del RNA y su posterior análisis de secuencia de nucleótidos para finalmente hacer la identificación de un nuevo género y especie viral para los humanos que estaba circulando sin ser detectado por los métodos diagnósticos del momento³. La secuenciación de nueva generación (NGS) promete ser una plataforma de apoyo en la investigación virológica importante aunque aún no para el diagnóstico de rutina sino para la identificación de virus no incluidos en las pruebas diagnósticas actuales^{150,151}. En general, otras plataformas moleculares como la PCR en sus diversas versiones (RT-PCR, nested PCR, Real time PCR, qRT-PCR) y las nuevas técnicas diagnósticas como microarreglos y técnicas basadas en nanopartículas como la plataforma Luminex™ también son prometedoras,

En resumen, el presente estudio es el primer reporte describiendo al HMPV como agente etiológico de las infecciones respiratorias agudas en la sala de urgencias y UCI pediátricas de la institución hospitalaria de tercer nivel más importante en el suroccidente colombiano, luego de dos décadas de los estudios pioneros de Berman *et al*¹⁰⁷ y Borrero *et al*¹⁰⁴ en la misma institución. Los resultados enfatizan la importancia de la vigilancia activa y el rol importante de los comités de infecciosas y epidemiología dentro de una institución hospitalaria. Se reconoce que el diagnóstico viral de rutina por

técnicas como la IFA y la RT-PCR en tiempo real es costoso, pero debido a su importancia se debe considerar para realizar vigilancia centinela a fin de poder determinar la circulación viral en instituciones hospitalarias que reciben población de una gran área geográfica. Con el aumento en enfermedades respiratorias emergentes y reemergentes, y en el número de casos de morbilidad asociados a virus como FluA H1N1, SARS-Coronavirus, MERS-Coronavirus, bocavirus, entre otros, el diagnóstico clínico temprano y efectivo de la etiología viral de las IRA es una prioridad. Además de proporcionar una orientación en el tratamiento específico, oportuno y el óptimo control sobre la transmisibilidad nosocomial de estas infecciones. Finalmente, los hallazgos de este estudio tienen especial relevancia a nivel local y nacional pues describe la prevalencia de un virus nuevo en la ciudad, el HMPV y expone la creciente necesidad de realizar vigilancia virológica activa y estrategias de comunicación para la actualización y divulgación de la epidemiología local.

8 Limitaciones

Una limitación del estudio es que no se presenta la vigilancia virológica para todo el año 2017. Se realizó la determinación de virus respiratorios en las primeras 20 semanas epidemiológicas del 2017 cuando se completó el tamaño de muestra calculado para el estudio, las cuales coinciden con la primera temporada de lluvias en el país entre marzo a mayo, temporada en la que se ha encontrado una mayor asociación con la frecuencia de RSV seguida por los meses de septiembre a noviembre en las regiones tropicales ¹⁵². Aunque no es completamente clara la asociación entre la frecuencia de casos de IRA viral y factores meteorológicos como lluvias, humedad relativa, temperatura, velocidad del viento y radiación solar, las temporadas de lluvias y las temperaturas cálidas en los países de la zona ecuatorial como Colombia suponen un favorecimiento en la transmisión del virus de forma estable todo el año. Adicionalmente, se continúa realizando el examen para virus respiratorios por IFA para los pacientes de la sala de urgencias pediátricas del HUV y se extendió a las salas de cuidado intensivo pediátrico y neonatal para realizar la descripción de las infecciones virales respiratorias durante todo el año. Sin embargo, el propósito de este estudio fue la exploración de etiología viral por HMPV en IRA de niños menores de dos años como la población blanco más susceptible a morbimortalidad por estas infecciones.

Otra limitación del estudio fue que no se pudo contar con una tercera prueba para definir los resultados no concordantes entre la IFA y el RT-PCR para RSV. A pesar de que no se realizó una tercera prueba como contrareferencia a la técnica de PCR en tiempo real se consideran válidos todos los resultados del presente estudio dado que se utilizó un estuche comercial avalado para el Diagnóstico In Vitro (IVD) por la FDA y que se utiliza en el diagnóstico clínico de rutina en otros países del continente. La detección de otros virus como Rinovirus, Enterovirus y Bocavirus humano, no fue considerada para el estudio dado que aunque tienen alta prevalencia en la población general son de baja carga de enfermedad por IRA en la población pediátrica ^{153,154}; lo cual se ratifica en que los virus de mayor importancia clínica fueron RSV y HMPV explicando cerca del 80% de las etiologías virales.

9 Conclusiones

El HMPV es el segundo virus más frecuentemente detectado en niños menores de dos años con IRA. Su prevalencia para esta población fue 16.98% (IC95%: 11.15-26.56%) para las 20 primeras semanas epidemiológicas del año, 4.69 veces más alta que la frecuencia calculada para todas las edades en Colombia en el 2014.

Las características clínicas y demográficas entre RSV y HMPV son indistinguibles, sin embargo los niños afectados por HMPV fueron mayores en edad que los niños afectados por otros virus. Por lo que se podría sospechar de una infección por HMPV en niños con signos y síntomas de IRA de mayores a tres meses.

El sitio anatómico para toma de muestra (nasofaringe vs vestíbulo nasal) y la metodología usada para tal fin (aspirado vs hisopado) son un factor influyente sobre los resultados de la IFA, por lo que este estudio recomienda el uso de aspirados nasofaríngeos para la toma de muestra de secreción respiratoria para el examen de virus respiratorios por IFA. Esta muestra igualmente serviría para la detección molecular

La prueba diagnóstica molecular evaluada tuvo una alta concordancia para la detección de HMPV lo cual indica que para HMPV puede utilizarse la IFA o el RT-PCR en tiempo real como diagnóstico clínico de rutina, la dependencia de elección entre una u otra prueba podría ser la costo-efectividad de las pruebas. Sin embargo para RSV se sugiere el uso del RT-PCR en tiempo real como prueba confirmatoria.

10 Perspectivas

RSV y HMPV son los dos virus blancos a detectar en lactantes con IRA y alta sospecha clínica de etiología viral.

La prueba dúplex de RT-PCR en tiempo real RSV/HMPV r-gene® podría utilizarse en el diagnóstico clínico como prueba confirmatoria para la infección por estos virus.

Estudios filogenéticos sobre las cepas circulantes de HMPV y RSV complementarían los hallazgos presentados en este estudio. Lo anterior permitiría establecer los subtipos de ambos virus presentes en el país, con lo cual se tendría mayor conocimiento para la toma de decisiones en salud pública sobre la introducción de vacunas al país para estos virus.

11 Referencias bibliográficas

1. World Health Organization. Global Health Observatory data repository: Colombia. Data analysis. <http://apps.who.int/gho/data/view.main.ghe1002015-COL?lang=en>. Published 2016. Accessed July 6, 2016.
2. Modjarrad K, Giersing B, Kaslow DC, Smith PG, Moorthy VS. WHO report: WHO consultation on Respiratory Syncytial Virus Vaccine Development Report from a World Health Organization Meeting held on 23-24 March 2015. *Vaccine*. 2016;34(2):190-197. doi:10.1016/j.vaccine.2015.05.093.
3. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med*. 2001;7(6):719-724. doi:10.1038/89098.
4. Espinal DA, Hurtado IC, Arango AE, García J, Laguna-Torres VA, Jaramillo S. [Human metapneumovirus in children: first cases in Colombia]. *Biomedica*. 2012;32(2):174-178. doi:10.1590/S0120-41572012000300003.
5. Barbosa Ramirez J, Pulido Dominguez P, Rey Benito G, Mendez Rico J, Castellanos J, Páez Martínez A. Human respiratory syncytial virus and metapneumovirus in patients with acute respiratory infection in Colombia, 2000 – 2011. *Pan Am J Public Heal*. 2014;36(6):101-109.
6. World Health Organization. The top 10 causes of death. World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>. Published 2017. Accessed September 19, 2017.
7. Williams BG, Gouws E, Boschi-Pinto C, Bryce J, Dye C. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. *Lancet Infect Dis*. 2002;2(1):25-32.
8. Liu L, Johnson HL, Cousens S, et al. Global, regional, and national causes of child mortality: An updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet*. 2012;379(9832):2151-2161. doi:10.1016/S0140-6736(12)60560-1.
9. Rudan I, Boschi-Pinto C, Biloglav Z, Mulholland K, Campbell H. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. *Bull World Health Organ*. 2008;86(5):408-416. doi:10.2471/BLT.07.048769.
10. Shann F. Etiology of severe pneumonia in children in developing countries. *Pediatr Infect Dis*. 1986;5(2):247-252.
11. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2010;375(9725):1545-1555. doi:10.1016/S0140-6736(10)60206-1.
12. Nair H, Simões EAF, Rudan I, et al. Global and regional burden of hospital admissions for severe acute lower respiratory infections in young children in 2010: a systematic analysis. *Lancet*. 2013;381(9875):1380-1390. doi:10.1016/S0140-6736(12)61901-1.
13. Shi T, McLean K, Campbell H, Nair H. Aetiological role of common respiratory viruses in acute lower respiratory infections in children under five years: A systematic review and meta-analysis. *J Glob Health*. 2015;5(1):010408. doi:10.7189/jogh.05.010408.
14. Chow WZ, Chan YF, Oong XY, et al. Genetic diversity, seasonality and transmission network of human metapneumovirus: identification of a unique sub-lineage of the fusion and attachment genes. *Sci Rep*. 2016;6:27730. doi:10.1038/srep27730.
15. Sastre P, Ruiz T, Schildgen O, Schildgen V, Vela C, Rueda P. Seroprevalence of human respiratory syncytial virus and human metapneumovirus in healthy population analyzed by recombinant fusion protein-based enzyme linked immunosorbent assay. *Virol J*. 2012;9(1):130. doi:10.1186/1743-422X-9-130.
16. Afonso CL, Amarasinghe GK, Bányai K, et al. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Arch Virol*. 2016;161(8):2351-2360. doi:10.1007/s00705-016-2880-1.
17. Papenburg J, Boivin G. The distinguishing features of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol*. 2010;20(1):245-260. doi:10.1002/rmv.651.
18. Schildgen V, van den Hoogen B, Fouchier R, et al. Human metapneumovirus: Lessons learned over the first decade. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(4):734-754. doi:10.1128/CMR.00015-11.
19. Feuillet F, Lina B, Rosa-Calatrava M, Boivin G. Ten years of human metapneumovirus research. *J Clin Virol*. 2012;53(2):97-105. doi:10.1016/j.jcv.2011.10.002.

20. INS. *Protocolo de Vigilancia En Salud Pública Infección Respiratoria Aguda (IRA)*. Bogotá, Colombia; 2016. http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/subdireccion-vigilancia/sivigila/protocolos_sivigila/pro_infeccion_respiratoria_aguda_ira.pdf.
21. Aberle JH, Aberle SW, Redlberger-Fritz M, Sandhofer MJ, Popow-Kraupp T. Human metapneumovirus subgroup changes and seasonality during epidemics. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29(11):1016-1018. doi:10.1097/INF.0b013e3181e3331a.
22. Talavera GA, Mézquita NED, Investigaciones C De, Hideyo R, Biomedicina D De, Infecciosas DE. Short Report : Human Metapneumovirus in Children With Influenza-Like Illness in Yucatan , Mexico. *Am J Trop Med Hygiene*. 2007;76(1):182-183.
23. Laguna-Torres VA, Sánchez-Largaespada JF, Lorenzana I, et al. Influenza and other respiratory viruses in three Central American countries. *Influenza Other Respi Viruses*. 2011;5(2):123-134. doi:10.1111/j.1750-2659.2010.00182.x.
24. Mccracken JP, Arvelo W, Ortiz J, et al. Comparative epidemiology of human metapneumovirus- and respiratory syncytial virus-associated hospitalizations in Guatemala. *Influenza Other Respi Viruses*. 2014;8(4):414-421. doi:10.1111/irv.12251.
25. Ulloa-Gutiérrez R, Vargas-Jiménez F, Mora-Chavarría A, Umaña MA, Clavo-Espinoza M, Alfaro-Bourrouet W. Human Metapneumovirus en Costa Rica. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28(5):452-453.
26. Tovar H CE, Moncho S A, Fernandez S D, Aguilar M MS, Morón D. Estudio clínico-epidemiológico y molecular de Metapneumovirus Humano en pacientes con Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) en Venezuela. *Rev del Inst Nac Hig Rafael Rangel*. 2014;45:84-101. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772014000100006&nrm=iso.
27. Jonnalagadda S, Rodríguez O, Estrella B, Sabin LL, Sempértegui F, Hamer DH. Etiology of severe pneumonia in Ecuadorian children. *PLoS One*. 2017;12(2):1-19. doi:10.1371/journal.pone.0171687.
28. Gray GC, Capuano AW, Setterquist SF, et al. Human Metapneumovirus, Peru. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(2):347-350. doi:10.3201/eid1202.051133.
29. Carneiro BM, Yokosawa J, Arbiza J, et al. Detection of All Four Human Metapneumovirus Subtypes in Nasopharyngeal Specimens from Children with Respiratory Disease in Uberlandia , Brazil. *J Med Virol*. 2009;81(May):1814-1818. doi:10.1002/jmv.
30. Oliveira DB., Durigon EL, Carvalho AC, et al. Epidemiology and genetic variability of human metapneumovirus during a 4-year-long study in Southeastern Brazil. *J Med Virol*. 2009;81:915-921. doi:10.1002/jmv.21436.
31. Pizzorno A, Masner M, Medici C, et al. Molecular detection and genetic variability of human metapneumovirus in Uruguay. *J Med Virol*. 2010;82(5):861-865. doi:10.1002/jmv.21752.
32. Vázquez C, Villalba S, Gamarra ML, et al. Detección de Metapneumovirus Humano en niños menores de 5 años hospitalizados en Paraguay. *Rev la Soc Boliv Pediatría*. 2013;52:43-49.
33. Luchsinger F V, Escobar CC, Avendano CLF. Detection of human metapneumovirus in children hospitalized for acute lower respiratory infection in Santiago, Chile. *Rev Med Chil*. 2005;133 (9):1059-1064. <http://www.scielo.cl/pdf/rmc/v133n9/art09.pdf>.
34. Galiano M, Videla C, Puch SS, Martínez A, Echavarría M, Carballal G. Evidence of Human Metapneumovirus in Children in Argentina. *J Med Virol*. 2004;72(2):299-303. doi:10.1002/jmv.10536.
35. Berry M, Gamielien J, Fielding B. Identification of New Respiratory Viruses in the New Millennium. *Viruses*. 2015;7(3):996-1019. doi:10.3390/v7030996.
36. Bharaj P, Sullender WM, Kabra SK, et al. Respiratory viral infections detected by multiplex PCR among pediatric patients with lower respiratory tract infections seen at an urban hospital in Delhi from 2005 to 2007. *Virol J*. 2009;6:89. doi:10.1186/1743-422X-6-89.
37. Raymond F, Carbonneau J, Boucher N, et al. Comparison of automated microarray detection with real-time PCR assays for detection of respiratory viruses in specimens obtained from children. *J Clin Microbiol*. 2009;47(3):743-750. doi:10.1128/JCM.01297-08.
38. Pillet S, Lardeux M, Dina J, et al. Comparative Evaluation of Six Commercialized Multiplex PCR Kits for the Diagnosis of Respiratory Infections. *PLoS One*. 2013;8(8):e72174. doi:10.1371/journal.pone.0072174.
39. Salez N, Vabret A, Leruez-Ville M, et al. Evaluation of Four Commercial Multiplex Molecular Tests for the Diagnosis of Acute Respiratory Infections. *PLoS One*. 2015;10(6):e0130378. doi:10.1371/journal.pone.0130378.
40. Boonham N, Kreuze J, Winter S, et al. Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation

- sequencing. *Virus Res.* 2014;186:20-31. doi:10.1016/j.virusres.2013.12.007.
41. Paba P, Farchi F, Mortati E, et al. Screening of respiratory pathogens by Respiratory Multi Well System (MWS) r-gene??? assay in hospitalized patients. *New Microbiol.* 2014;37(2):231-236.
42. Florin TA, Plint AC, Zorc JJ. Viral bronchiolitis. *Lancet.* 2017;389(10065):211-224. doi:10.1016/S0140-6736(16)30951-5.
43. Mirazo S, Ruchansky D, Blanc A, Arbiza J. Serologic evidence of human metapneumovirus circulation in Uruguay. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100(7):715-718. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16410956.
44. Ebihara T, Endo R, Kikuta H, et al. Seroprevalence of human metapneumovirus in Japan. *J Med Virol.* 2003;70. doi:10.1002/jmv.10391.
45. Liu L, Bastien N, Sidaway F, Chan E, Li Y. Seroprevalence of human metapneumovirus (hMPV) in the Canadian province of Saskatchewan analyzed by a recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J Med Virol.* 2007;79. doi:10.1002/jmv.20799.
46. Banerjee S, Sullender WM, Ahuja RK, Broor S. Seroepidemiological study of human metapneumovirus in New Delhi, India. *Indian J Med Microbiol.* 2011;29(4):363-367. doi:10.4103/0255-0857.90162.
47. Wolf DG, Zakay-Rones Z, Fadeela A, Greenberg D, Dagan R. High seroprevalence of human metapneumovirus among young children in Israel. *J Infect Dis.* 2003;188(12):1865-1867. doi:10.1086/380100.
48. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology / Editors-in-Chief, David M. Knipe, Peter M. Howley, Jeffrey I. Cohen, Diane E. Griffin, Robert A. Lamb, Malcom A. Martin, Vincent R. Racaniello, Bernard Roizman.* 6th ed. (Knipe DM, Howley PM, eds.). Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, c2013; 2013.
49. Van Den Hoogen BG, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Analysis of the Genomic Sequence of a Human Metapneumovirus. *Virology.* 2002;295:119-132. doi:10.1006/viro.2001.1355.
50. Amarasinghe GK, Bao Y, Basler CF, et al. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2017. *Arch Virol.* 2017;162(8):2493-2504. doi:10.1007/s00705-017-3311-7.
51. Bastien N, Liu L, Ward D, Taylor T, Li Y. Genetic Variability of the G Glycoprotein Gene of Human Metapneumovirus. *J Clin Microbiol.* 2004;42(8):3532-3537. doi:10.1128/JCM.42.8.3532.
52. Van Den Hoogen BG, Herfst S, Sprong L, et al. Antigenic and Genetic Variability of Human Metapneumoviruses. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(4):658-666. doi:10.3201/eid1004.030393.
53. Ludewick HP, Abed Y, Van Niekerk N, Boivin G, Klugman KP, Madhi SA. Human metapneumovirus genetic variability, South Africa. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(7):1074-1078. doi:10.3201/eid1107.050050.
54. Huck B, Scharf G, Neumann-Haefelin D, Puppe W, Weigl J, Falcone V. Novel human metapneumovirus sublineage. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(1):147-150. doi:10.3201/eid1201.050772.
55. Garcia J, Sovero M, Kochel T, et al. Human metapneumovirus strains circulating in Latin America. *Arch Virol.* 2012;157(3):563-568. doi:10.1007/s00705-011-1204-8.
56. Choudhary ML, Anand SP, Sonawane NS, Chadha MS. Development of real-time RT-PCR for detection of human metapneumovirus and genetic analysis of circulating strains (2009-2011) in Pune, India. *Arch Virol.* 2014;159(2):217-225. doi:10.1007/s00705-013-1812-6.
57. Li H, Wei Q, Tan A, Wang L. Epidemiological analysis of respiratory viral etiology for influenza-like illness during 2010 in Zhuhai, China. *Virology.* 2013;10:143. doi:10.1186/1743-422X-10-143.
58. Taylor S, Lopez P, Weckx L, et al. Respiratory viruses and influenza-like illness: Epidemiology and outcomes in children aged 6 months to 10 years in a multi-country population sample. *J Infect.* 2017;74(1):29-41. doi:10.1016/j.jinf.2016.09.003.
59. Esper F, Boucher D, Weibel C, Martinello R a, Kahn JS. Human metapneumovirus infection in the United States: clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children. *Pediatrics.* 2003;111(6 Pt 1):1407-1410. doi:10.1542/peds.111.6.1407.
60. Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, et al. Seasonal patterns of respiratory syncytial virus, influenza A virus, human metapneumovirus, and parainfluenza virus type 3 infections on the basis of virus isolation data between 2004 and 2011 in Yamagata, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2013;66(2):140-145.
61. Edwards KM, Zhu Y, Griffin MR, et al. Burden of human metapneumovirus infection in young children. *N Engl J Med.* 2013;368(7):633-643. doi:10.1056/NEJMoa1204630.
62. Liu L, Bastien N, Li Y. Intracellular Processing, Glycosylation, and Cell Surface Expression of Human

- Metapneumovirus Attachment Glycoprotein . *J Virol.* 2007;81(24):13435-13443. doi:10.1128/JVI.01469-07.
63. Adamson P, Thammawat S, Muchondo G, Sadlon T, Gordon D. Diversity in Glycosaminoglycan Binding Amongst hMPV G Protein Lineages. *Viruses.* 2012;4(12):3785-3803. doi:10.3390/v4123785.
64. Cox RG, Williams J V. Breaking in: Human metapneumovirus fusion and entry. *Viruses.* 2013;5(1):192-210. doi:10.3390/v5010192.
65. Cseke G, Maginnis MS, Cox RG, et al. Integrin alphavbeta1 promotes infection by human metapneumovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(5):1566-1571. doi:10.1073/pnas.0801433106.
66. Schowalter RM, Smith SE, Dutch RE. Characterization of human metapneumovirus F protein-promoted membrane fusion: critical roles for proteolytic processing and low pH. *J Virol.* 2006;80(22):10931-10941. doi:10.1128/JVI.01287-06.
67. Bao X, Kolli D, Liu T, Shan Y, Garofalo RP, Casola A. Human Metapneumovirus Small Hydrophobic Protein Inhibits NF-KB Transcriptional Activity. *J Virol.* 2008;82(16):8224-8229. doi:10.1128/JVI.02584-07.
68. de Graaf M, Herfst S, Schrauwen EJA, et al. Specificity and functional interaction of the polymerase complex proteins of human and avian metapneumoviruses. *J Gen Virol.* 2008;89(4):975-983. doi:10.1099/vir.0.83537-0.
69. van den Hoogen BG, van Doornum GJJ, Fockens JC, et al. Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. *J Infect Dis.* 2003;188(10):1571-1577. doi:10.1086/379200.
70. Moe N, Krokstad S, Stenseng IH, et al. Comparing Human Metapneumovirus and Respiratory Syncytial Virus: Viral Co-Detections, Genotypes and Risk Factors for Severe Disease. *PLoS One.* 2017;12(1):e0170200. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170200>.
71. Wyde PR, Chetty SN, Jewell AM, Schoonover SL, Piedra PA. Development of a cotton rat-human metapneumovirus (hMPV) model for identifying and evaluating potential hMPV antivirals and vaccines. *Antiviral Res.* 2005;66(1):57-66. doi:10.1016/j.antiviral.2004.12.009.
72. Kahn JS. Epidemiology of human metapneumovirus. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(3):546-557. doi:10.1128/CMR.00014-06.
73. Groome MJ, Moyes J, Cohen C, et al. Human metapneumovirus-associated severe acute respiratory illness hospitalisation in HIV-infected and HIV-uninfected South African children and adults. *J Clin Virol.* 2015;69:125-132. doi:10.1016/j.jcv.2015.06.089.
74. Garcia-Garcia ML, Calvo C, Casas I, et al. Human metapneumovirus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma at age 5. *Pediatr Pulmonol.* 2007;42(5):458-464. doi:10.1002/ppul.20597.
75. Maitre NL, Williams J V. Human metapneumovirus in the preterm neonate: current perspectives. *Res reports Neonatol.* 2016;6:41-49. doi:10.2147/RRN.S76270.
76. Boivin G, Abed Y, Pelletier G, et al. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis.* 2002;186(9):1330-1334. doi:10.1086/344319.
77. Williams J V, Tollefson SJ, Nair S, Chonmaitree T. Association of human metapneumovirus with acute otitis media. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2006;70(7):1189-1193. doi:10.1016/j.ijporl.2005.12.007.
78. Arnold JC, Singh KK, Milder E, et al. Human metapneumovirus associated with central nervous system infection in children. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28(12):1057-1060. doi:10.1097/INF.0b013e3181acd221.
79. Debiaggi M, Canducci F, Ceresola ER, Clementi M. The role of infections and coinfections with newly identified and emerging respiratory viruses in children. *Virol J.* 2012;9(1):247. doi:10.1186/1743-422X-9-247.
80. Canducci F, Debiaggi M, Sampaolo M, et al. Two-year prospective study of single infections and co-infections by respiratory syncytial virus and viruses identified recently in infants with acute respiratory disease. *J Med Virol.* 2008;80(4):716-723. doi:10.1002/jmv.21108.
81. Semple MG, Cowell A, Dove W, et al. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *J Infect Dis.* 2005;191(3):382-386. doi:10.1086/426457.
82. van Woensel JBM, Bos AP, Lutter R, Rossen JWA, Schuurman R. Absence of human metapneumovirus co-infection in cases of severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Pulmonol.* 2006;41(9):872-874. doi:10.1002/ppul.20459.
83. Márquez-Escobar VA. Current developments and prospects on human metapneumovirus vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2017;16(5):419-431. doi:10.1080/14760584.2017.1283223.
84. Higgins D, Trujillo C, Keech C. Advances in RSV vaccine research and development – A global agenda.

- Vaccine. 2016;34(26):2870-2875. doi:10.1016/j.vaccine.2016.03.109.
85. Yim KC, Cragin RP, Boukhvalova MS, et al. Human metapneumovirus: enhanced pulmonary disease in cotton rats immunized with formalin-inactivated virus vaccine and challenged. *Vaccine*. 2007;25(27):5034-5040. doi:10.1016/j.vaccine.2007.04.075.
86. Fulginiti VA, Eller JJ, Sieber OF, Joyner JW, Minamitani M, Meiklejohn G. Respiratory virus immunization. I. A field trial of two inactivated respiratory virus vaccines; an aqueous trivalent parainfluenza virus vaccine and an alum-precipitated respiratory syncytial virus vaccine. *Am J Epidemiol*. 1969;89(4):435-448.
87. Talaat KR, Karron RA, Thumar B, et al. Experimental Infection of Adults With Recombinant Wild-Type Human Metapneumovirus. *J Infect Dis*. 2013;208(10):1669-1678. doi:10.1093/infdis/jit356.
88. Lévy C, Aerts L, Hamelin MÉ, et al. Virus-like particle vaccine induces cross-protection against human metapneumovirus infections in mice. *Vaccine*. 2013;31(25):2778-2785. doi:10.1016/j.vaccine.2013.03.051.
89. Giersing BK, Vekemans J, Nava S, Kaslow DC, Moorthy V. Report from the World Health Organization's third Product Development for Vaccines Advisory Committee (PDVAC) meeting, Geneva, 8-10th June 2016. *Vaccine*. 2017;In Press, (Epub ahead of print):8-10. doi:10.1016/j.vaccine.2016.10.090.
90. Corti D, Bianchi S, Vanzetta F, et al. Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody. *Nature*. 2013;501(7467):439-443. doi:10.1038/nature12442.
91. Wen X, Pickens J, Mousa JJ, et al. A Chimeric Pneumovirus Fusion Protein Carrying Neutralizing Epitopes of Both MPV and RSV. *PLoS One*. 2016;11(5):1-17. doi:10.1371/journal.pone.0155917.
92. Wen X, Mousa JJ, Bates JT, Lamb RA, Crowe JE, Jardetzky TS. Structural basis for antibody cross-neutralization of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus. *Nat Microbiol*. 2017;2(January):16272. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.272.
93. Reina J, Ferres F, Alcoceba E, Mena A, de Gopegui ER, Figuerola J. Comparison of different cell lines and incubation times in the isolation by the shell vial culture of human metapneumovirus from pediatric respiratory samples. *J Clin Virol*. 2007;40(1):46-49. doi:10.1016/j.jcv.2007.06.006.
94. Millipore. Light Diagnostics™ Human Metapneumovirus DFA. August 2012, Revision B; 3124MAN. [https://www.emdmillipore.com/US/en/product/LIGHT-DIAGNOSTICS™-Human-Metapneumovirus-\(hMPV\)-Direct-Immunofluorescence-Assay,-~50-tests,MM_NF-3124#documentation](https://www.emdmillipore.com/US/en/product/LIGHT-DIAGNOSTICS™-Human-Metapneumovirus-(hMPV)-Direct-Immunofluorescence-Assay,-~50-tests,MM_NF-3124#documentation). Published 2012. Accessed November 12, 2016.
95. Millipore. Light Diagnostics™ Respiratory Panel Viral Screening and Identification IFA Kit. ©2012 EMD Millipore Corporation a division of Merck KGaA, Darmstadt, Germany. https://www.emdmillipore.com/US/en/product/LIGHT-DIAGNOSTICS™-Respiratory-Panel-I-Viral-Screening-and-Identification-IFA,MM_NF-3105#documentation. Published 2012. Accessed November 12, 2016.
96. bioMérieux. RSV/hMPV MWS R-Gene® Packet Insert. Marcy-l'Etoile, France; 2013.
97. Tal A, Bavilski C, Yohai D, Bearman JE, Gorodischer R, Moses SW. Dexamethasone and salbutamol in the treatment of acute wheezing in infants. *Pediatrics*. 1983;71(1):13-18.
98. Mella C, Suarez-Arrabal MC, Lopez S, et al. Innate immune dysfunction is associated with enhanced disease severity in infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis*. 2013;207(4):564-573. doi:10.1093/infdis/jis721.
99. Suárez-Arrabal MC, Mella C, Lopez SM, et al. Nasopharyngeal bacterial burden and antibiotics: Influence on inflammatory markers and disease severity in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect*. 2015;71(4):458-469. doi:10.1016/j.jinf.2015.06.010.
100. Mejias A, Dimo B, Suarez NM, et al. Whole Blood Gene Expression Profiles to Assess Pathogenesis and Disease Severity in Infants with Respiratory Syncytial Virus Infection. *PLoS Med*. 2013;10(11). doi:10.1371/journal.pmed.1001549.
101. García C, Soriano-Fallas A, Lozano J, et al. Decreased Innate Immune Cytokine Responses Correlate With Disease Severity in Children With Respiratory Syncytial Virus and Human Rhinovirus Bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31(1):86-89. doi:10.1097/INF.0b013e31822dc8c1.
102. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-174.
103. Dean A, Sullivan K, Soe M. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Versión 3.01. <http://www.openepi.com/DiagnosticTest/DiagnosticTest.htm>. Published 2013. Accessed September 1, 2017.
104. Borrero I, Fajardo L, Bedoya A, Zea A, Carmona F, Borrero MF De. Acute respiratory tract infections among a birth cohort of children from Cali, Colombia, who were studied through 17 months of age. *Rev Infect Dis*. 1990;12(8):S950-S956.

105. Rodriguez-Martinez CE, Rodriguez DA, Nino G. Respiratory syncytial virus, adenoviruses, and mixed acute lower respiratory infections in children in a developing country. *J Med Virol*. 2015;781(20):774-781. doi:10.1002/jmv.
106. Pineros JG, Baquero H, Bastidas J, et al. Respiratory syncytial virus infection as a cause of hospitalization in population under 1 year in Colombia. *J Pediatr (Rio J)*. 2013;89(6):544-548. doi:10.1016/j.jpeds.2013.04.002.
107. Berman S, Duenas A, Bedoya A, et al. Acute lower respiratory tract illnesses in Cali, Colombia: a two-year ambulatory study. *Pediatrics*. 1983;71(2):210-218.
108. Bedoya VI, Abad V, Trujillo H. Frequency of respiratory syncytial virus in hospitalized infants with lower acute respiratory tract infection in Colombia. *Pediatr Infect Dis J*. 1996;15(12):1123-1124.
109. Barbosa J, Daza J, Malo P. Vigilancia epidemiológica y virológica de influenza y otros virus respiratorios, en Colombia 2000 - 2014. 2014.
110. Poehling KA, Edwards KM, Weinberg GA, et al. The underrecognized burden of influenza in young children. *N Engl J Med*. 2006;355(1):31-40. doi:10.1056/NEJMoa054869.
111. Weinberg GA, Hall CB, Iwane MK, et al. Parainfluenza Virus Infection of Young Children: Estimates of the Population-Based Burden of Hospitalization. *J Pediatr*. 2009;154(5). doi:10.1016/j.jpeds.2008.11.034.
112. Hall CB, Weinberg GA, Poehling KA, Erdman D, Grijalva CG, Zhu Y. The Burden of Respiratory Syncytial Virus Infection in Young Children. *N Engl J Med*. 2009;360:588-598.
113. Ralston SL, Lieberthal AS, Meissner HC, et al. Clinical Practice Guideline: The Diagnosis, Management, and Prevention of Bronchiolitis. *Pediatrics*. 2014;134(5):e1474-e1502. doi:10.1542/peds.2014-2742.
114. Harris J-AS, Huskins WC, Langley JM, Siegel JD. Health care epidemiology perspective on the October 2006 recommendations of the Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis. *Pediatrics*. 2007;120(4):890-892. doi:10.1542/peds.2007-1305.
115. Linstow M-L von, Eugen-Olsen J, Koch A, Winther TN, Westh H, Høgh B. Excretion patterns of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus among young children. *Eur J Med Res*. 2006;11:329-335.
116. De Roeck D, Wang S. *Principles and Considerations for Adding a Vaccine to a National Immunization Programme*. World Health Organization; 2014. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/111548/1/9789241506892_eng.pdf.
117. Rohani P, Earn DJ, Finkenstädt B, Grenfell BT. Population dynamic interference among childhood diseases. *Proc Biol Sci*. 1998;265(1410):2033-2041. doi:10.1098/rspb.1998.0537.
118. Bhattacharyya S, Gesteland PH, Korgenski K, Bjørnstad ON, Adler FR. Cross-immunity between strains explains the dynamical pattern of paramyxoviruses. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(43):201516698. doi:10.1073/pnas.1516698112.
119. Ministerio de Salud y Protección Social. *Actualización de La Recomendación Sobre El Uso de Palivizumab*, 2013 – 2014. Colombia; 2014.
120. Rueda JD, Rosselli D, Ruiz-Pelaez JG. Cost-effectiveness of Respiratory Syncytial virus Infection (RSV) Prophylaxis with Palivizumab in Preterm Infants in Colombia. *Coyunt Económica Investig Económica y Soc*. 2013;43(2).
121. Peiris JSM, Tang WH, Chan KH, et al. Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(6):628-633. doi:10.3201/eid0906.030009.
122. Hoogen V den, G. B, OSTERHAUS DME, FOUCHIER RAM. Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23(Supplement):S25-S32. doi:10.1097/01.inf.0000108190.09824.e8.
123. Panda S, Mohakud NK, Pena L, Kumar S. Human metapneumovirus: Review of an important respiratory pathogen. *Int J Infect Dis*. 2014;25:45-52. doi:10.1016/j.ijid.2014.03.1394.
124. García-García ML, Calvo C, Rey C, et al. Human metapneumovirus infections in hospitalized children and comparison with other respiratory viruses. 2005-2014 prospective study. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173504. doi:10.1371/journal.pone.0173504.
125. Domachowske JB, Rosenberg HF. Respiratory syncytial virus infection: immune response, immunopathogenesis, and treatment. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(2):298-309.
126. Lambert L, Sagfors AM, Openshaw PJM, Culley FJ. Immunity to RSV in Early-Life. *Front Immunol*. 2014;5:466. doi:10.3389/fimmu.2014.00466.
127. Vehapoglu A, Turel O, Uygur Sahin T, Kutlu NO, Iscan A. Clinical Significance of Human Metapneumovirus in Refractory Status Epilepticus and Encephalitis: Case Report and Review of the Literature. *Case Rep Neurol Med*. 2015;2015:131780. doi:10.1155/2015/131780.

128. Bosis S, Esposito S, Osterhaus ADME, et al. Association between high nasopharyngeal viral load and disease severity in children with human metapneumovirus infection. *J Clin Virol.* 2008;42(3):286-290. doi:10.1016/j.jcv.2008.03.029.
129. Greensill J, McNamara PS, Dove W, Flanagan B, Smyth RL, Hart CA. Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(3):372-375. doi:10.3201/eid0903.020289.
130. Piedra F-A, Mei M, Avadhanula V, et al. The interdependencies of viral load, the innate immune response, and clinical outcome in children presenting to the emergency department with respiratory syncytial virus-associated bronchiolitis. *PLoS One.* 2017;12(3):e0172953. doi:10.1371/journal.pone.0172953.
131. Merekoulis G, Alexopoulos EC, Belezos T, Panagiotopoulou E, Jelastopulu E. Lymphocyte to monocyte ratio as a screening tool for influenza. *PLoS Curr.* 2010;(MAR):2-7. doi:10.1371/currents.RRN1154.
132. Cunha BA, Connolly JJ, Irshad N. The clinical usefulness of lymphocyte:monocyte ratios in differentiating influenza from viral non-influenza-like illnesses in hospitalized adults during the 2015 influenza A (H3N2) epidemic: the uniqueness of HPIV-3 mimicking influenza A. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;35(1):155-158. doi:10.1007/s10096-015-2521-8.
133. Frayha H, Castriciano S, Mahony J, Chernesky MAX. aspirates equally effective for the diagnosis of viral respiratory disease in hospitalized Nasopharyngeal Swabs and Nasopharyngeal Aspirates Equally Effective for the Diagnosis of Viral Respiratory Disease in. *J Clin Microbiol.* 1989;27(6):1387-1389.
134. Heikkinen T, Salmi a a, Ruuskanen O. Comparative study of nasopharyngeal aspirate and nasal swab specimens for detection of influenza. *BMJ.* 2001;322(January):138. doi:10.1136/bmj.322.7279.138.
135. Ipp M, Carson S, Petric M, Parkin PC. Rapid painless diagnosis of viral respiratory infection. *Arch Dis Child.* 2002;86(5):372-373. doi:10.1136/adc.86.5.372.
136. Sung RYT, Chan PKS, Choi KC, et al. Comparative study of nasopharyngeal aspirate and nasal swab specimens for diagnosis of acute viral respiratory infection. *J Clin Microbiol.* 2008;46(9):3073-3076. doi:10.1128/JCM.01209-08.
137. Heikkinen T, Marttila J, Salmi AA, Ruuskanen O. Nasal swab versus nasopharyngeal aspirate for isolation of respiratory viruses. *J Clin Microbiol.* 2002;40(11):4337-4339. doi:10.1128/JCM.40.11.4337-4339.2002.
138. Macfarlane P, Denham J, Assous J, Hughes C. RSV testing in bronchiolitis: which nasal sampling method is best? *Arch Dis Child.* 2005;90(6):634-635. doi:10.1136/adc.2004.065144.
139. Moore C, Corden S, Sinha J, Jones R. Dry cotton or flocked respiratory swabs as a simple collection technique for the molecular detection of respiratory viruses using real-time NASBA. *J Virol Methods.* 2008;153(2):84-89. doi:10.1016/j.jviromet.2008.08.001.
140. Jokela P, Piiparinen H, Luiro K, Lappalainen M. Detection of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by duplex real-time RT-PCR assay in comparison with direct fluorescent assay. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(10):1568-1573. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03191.x.
141. ATCC. Converting TCID₅₀ to plaque forming units (PFU). FAQs - 07/25/2012. <https://www.atcc.org/support/faqs/48802/Converting+TCID50+to+plaque+forming+units+PFU-124.aspx>. Published 2012. Accessed October 2, 2017.
142. Jennings L, Deerlin VM Van, Gulley ML, Sources D. Recommended Principles and Practices for Validating Clinical Molecular Pathology Test. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133(May):743-755. doi:10.1043/1543-2165-133.5.743.
143. Landry ML, Cohen S, Ferguson D. Prospective study of human metapneumovirus detection in clinical samples by use of light diagnostics direct immunofluorescence reagent and real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2008;46(3):1098-1100. doi:10.1128/JCM.01926-07.
144. Reis AD, Fink MCD, Machado CM, et al. Comparison of direct immunofluorescence, conventional cell culture and polymerase chain reaction techniques for detecting respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates from infants. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008;50(1):37-40. doi:10.1590/S0036-46652008000100008.
145. van Elden LJR, van Kraaij MGJ, Nijhuis M, et al. Polymerase chain reaction is more sensitive than viral culture and antigen testing for the detection of respiratory viruses in adults with hematological cancer and pneumonia. *Clin Infect Dis.* 2002;34(2):177-183. doi:10.1086/338238.
146. Gerna G, Sarasini A, Percivalle E, et al. Prospective study of human metapneumovirus infection : Diagnosis , typing and virus quantification in nasopharyngeal secretions from pediatric patients. 2007;40:236-240. doi:10.1016/j.jcv.2007.08.001.
147. Chartrand C, Tremblay N, Renaud C. Diagnostic Accuracy of Rapid Antigen Detection Tests for Respiratory

- Syncytial Virus Infection: Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Microbiol.* 2015;53(12):3738-3749. doi:10.1128/JCM.01816-15.Editor.
148. Somerville LK, Ratnamohan VM, Dwyer DE, Kok J. Molecular diagnosis of respiratory viruses. *Pathology.* 2015;47(3):243-249. doi:10.1097/PAT.0000000000000240.
 149. Jartti T, Söderlund-Venermo M, Hedman K, Ruuskanen O, Mäkelä MJ. New molecular virus detection methods and their clinical value in lower respiratory tract infections in children. *Paediatr Respir Rev.* 2013;14(1):38-45. doi:10.1016/j.prrv.2012.04.002.
 150. Prachayangprecha S, Schapendonk CME, Koopmans MP, et al. Exploring the potential of next-generation sequencing in detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol.* 2014;52(10):3722-3730. doi:10.1128/JCM.01641-14.
 151. Thorburn F, Bennett S, Modha S, Murdoch D, Gunson R, Murcia PR. The use of next generation sequencing in the diagnosis and typing of respiratory infections. *J Clin Virol.* 2015;69:96-100. doi:10.1016/j.jcv.2015.06.082.
 152. Rodriguez-Martinez CE, Sossa-Briceno MP, Acuna-Cordero R. Relationship between meteorological conditions and respiratory syncytial virus in a tropical country. *Epidemiol Infect.* 2015;143(12):2679-2686. doi:10.1017/S0950268814003793.
 153. Costa LF, Queiróz DAO, Lopes da Silveira H, et al. Human Rhinovirus and Disease Severity in Children. *Pediatrics.* 2014;133(2):e312 LP - e321. <http://pediatrics.aappublications.org/content/133/2/e312.abstract>.
 154. Ruohola A, Waris M, Allander T, Ziegler T, Heikkinen T, Ruuskanen O. Viral etiology of common cold in children, Finland. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(2):344-346.

12 Anexos

12.1 Anexo 1. Formato de reporte de caso



FORMATO DE RECOLECCION DE INFORMACION PROYECTO METAPNEUMOVIRUS



I. INFORMACIÓN DEMOGRAFICA					
1. Código: <u>idcodigo</u>	2. Nombre(s): <u>idnombre</u>	3. Apellidos: <u>idapellidos</u>	4. Sexo(marque una X) 2.F () 1. M () <u>idsexo</u>	5. Fecha de nacimiento: DD/MM/AAAA <u>idnacimien</u>	6. Edad en meses: <u>idedad</u>
7. Raza: 1. Blanca () 2. Negra () 3. Mestiza () 4. Indígena () 5. Otro () <u>idraza</u>	8. Estrato socioeconómico: 1 () 2 () 3 () 4 () 5 () <u>idestrato</u>	9. Nombre del cuidador principal: 9.1 nombre, 9.2 teléfono, 9.3 dirección 9.4 barrio <u>idcuidador</u>	10. Parentesco: 1. Padres () 2. Tíos () 3. Abuelos () 4. Otro () <u>idparentes</u>	11. ¿Asiste a guardería o escuela?: 1. Si () 2. No () <u>idguarderi</u>	12. ¿Recibió lactancia materna?: 1. Si () 2. No () <u>idlactanci</u>
13. Si recibió lactancia materna: 1. Parcial () <u>idlactexcl</u> 2. Exclusiva () .13.1 duración en meses <u>idtimelact</u>					
II. ANTECEDENTES					
14. Vacuna: Neumococo () 14.1 Dosis ____ Influenza estacional () 14.2 Dosis ____ <u>anvacuna</u>	15. Tto con Palivizumab 1. Si () Dosis ____ 2. No () <u>anpali</u>	16. Cardiopatía congénita: 1. Si () 2. No () <u>ancardiop</u>	17. Enf Pulmonar Crónica: 1. Si () 2. No () <u>anenfpulm</u>	18. Inmunodeficiencia: 1. Si () 2. No () <u>aninmunod</u>	19. Tabaquismo en casa: 1. Si () 2. No () <u>antabag</u>
20. Peso al nacer en gramos: <u>anpeso</u>	21. Prematurez: 1. Si () 21.1 Semanas ____ 2. No () <u>anprematu</u>	22. Inicio de síntomas: DD/MM/AAAA <u>andatesint</u>	23. Fecha de ingreso: DD/MM/AAAA <u>andateingr</u>	24. Diagnóstico CIE-10 inicial: <u>andxinicio</u>	25. Fecha de recolección de muestra: DD/MM/AAAA <u>andatemx</u>
26. Lugar de recolección de muestra: Sala: 1. Urgencias 2. CIPAF 3. CIRENA 4. Anhelos de vida <u>ansala</u>	27. Tipo de muestra: 1. ANF () 2. LBA () <u>antipomx</u>	28. Fecha de egreso: DD/MM/AAAA <u>andateegre</u>	29. Diagnóstico CIE-10 de egreso: <u>andxegreso</u>	30. Diag de trabajo: 1. Laringotraqueobronquitis () 2. Bronquiolitis () 3. Neumonía () 4. Sepsis () 5. Sd tóxico () 6. Asma () <u>andxtrabaj</u>	
III. INFORMACIÓN CLÍNICA AL INGRESO: marcar con un X opción múltiple					
31. <u>icsintomas</u> Tos() Descarga o congestión nasal() Convulsiones() Conjuntivitis() Otalgia() Apnea() Estridor() Disfonia() Fiebre() Disnea ()					
32. Hemograma inicial: 32.1 <u>Leuco</u> citos: ____ 32.2 <u>Neutró</u> filos: ____ 32.3 <u>Info</u> citos: ____ 32.4 <u>Mono</u> citos: ____		33. PCR inicial: <u>icpcr</u>	34. Temperatura MÁXIMA axilar al ingreso o durante las 24 h de estancia hospitalaria: <u>ictemp</u>	35. Frec cardíaca: <u>icfreccard</u>	36. Peso: <u>icpesoact</u>
37. Rx de tórax del día de toma de la muestra o dentro de las 24 horas: marcar con una X 1. No tiene() 2. Normal() 3. Engrosamiento bronquial() 4. Atelectasia() 5. Opacidades sin consolidación() 6. Consolidación() 7. Hiperexpansión() <u>icrxtorax</u>					
IV. SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD					
38. Saturación de O ₂ : en porcentaje <u>svsatoxi</u>	39. Frecuencia respiratoria: <u>svfrecresp</u>	40. Auscultación <u>svausculta</u> 0. Normal () 1. Estertores o Roncus () 2. Cualquier Sibilancia () 3. Sibilancias Inspiratorias/ Expiratorias o Ventilación Ausente () <u>svmusculos</u>	41. Uso de músculos accesorios: 0. Ninguno () 1. Subcostal () 2. Intercostal () 3. Supraesternal/ bamboleo () <u>svmusculos</u>	42. Condición general <u>svcondicio</u> 0. Normal () 1. Anormal, irritable, pobre ingesta () 2. Necesidad LEV/alimentación por SNG () 3. Intubado ()	
43. Muerte durante la enfermedad: 1. Si () 2. No () <u>svmuerte</u>	44. Atribuible a la infx: 1. Si () 2. No () <u>svmuertxira</u>	45. Duración total de antibiótico: en días <u>svtimeanti</u>	46. Duración total de hospitalización: en días <u>svtimehospi</u>	47. Duración total de la ventilación invasiva: en días <u>svventilac</u>	48. Duración de O ₂ : en días <u>svtimeoxig</u>
		49. Duración total de UCI: en días <u>svtimeuci</u>	50. Salida: <u>svsalida</u> 1. A casa () 2. Remisión Nivel II () 3. Remisión UCI () 4. Muerte ()		

*Este formato fue adaptado de Lopez E. y colaboradores.

51. Firma quien diligencia el formato: dilfirma 52. Fecha : dilfecha

12.2 Anexo 2. Tabla de valores de referencia para hemograma

AGE-SPECIFIC LEUKOCYTE DIFFERENTIAL

Age	Total Leukocytes*	Neutrophils†	Lymphocytes		Monocytes	
	Mean (range)	Mean (range)	%	Mean (range)	%	Mean %
Birth	18.1 (9–30)	11 (6–26)	61	5.5 (2–11)	31	1.1 6
12 hr	22.8 (13–38)	15.5 (6–28)	68	5.5 (2–11)	24	1.2 5
24 hr	18.9 (9.4–34)	11.5 (5–21)	61	5.8 (2–11.5)	31	1.1 6
1 wk	12.2 (5–21)	5.5 (1.5–10)	45	5.0 (2–17)	41	1.1 9
2 wk	11.4 (5–20)	4.5 (1–9.5)	40	5.5 (2–17)	48	1.0 9
1 mo	10.8 (5–19.5)	3.8 (1–8.5)	35	6.0 (2.5–16.5)	56	0.7 7
6 mo	11.9 (6–17.5)	3.8 (1–8.5)	32	7.3 (4–13.5)	61	0.6 5
1 yr	11.4 (6–17.5)	3.5 (1.5–8.5)	31	7.0 (4–10.5)	61	0.6 5
2 yr	10.6 (6–17)	3.5 (1.5–8.5)	33	6.3 (3–9.5)	59	0.5 5

12.3 Anexo 3. Características de desempeño del LIGHT DIAGNOSTICS™ Respiratory Panel I Viral Screening and Identification IFA” Cat No. 3105:

MONOCLONAL ANTIBODIES:	Adeno	RSV	Influ A	Influ B	Para 1	Para 2	Para 3
True Positive	43	66	11	4	11	5	28
False Positive	0	0	0	0	0	0	0
True Negative	602	580	635	642	635	641	618
False Negative	1	0	0	0	0	0	0
Sensitivity (%)	97.7	100	100	100	100	100	100
Specificity (%)	100	100	100	100	100	100	100
Predictive Value Positive (%)	100	100	100	100	100	100	100
Predictive Value Negative (%)	99.8	100	100	100	100	100	100

12.4 Anexo 4. Escala de gravedad de la enfermedad

Variable/ Puntaje	0	1	2	3
Saturación de oxígeno	> 95%	92 - 95%	< 92% o suplemento de oxígeno	Ventilación invasiva o no invasiva con FIO ₂ > 35%
Frecuencia Respiratoria menores a 6 meses	< 40	41 - 55	56 - 70	> 70
Frecuencia Respiratoria mayores a 6 meses	< 30	31 - 45	46 - 60	> 60
Auscultación	Normal	Crepitos/roncus	Sibilancias	Sibilancias audibles a distancia o silencio respiratorio
Uso de músculos accesorios	Ninguno	Subcostal	Intercostal	Supraesternal/bamboleo
Actividad	Normal, alerta	Anormal, irritable, disminución de la tolerancia a la vía oral	Líquidos Endovenosos o Alimentación por sonda nasogástrica	Intubado
PUNTAJE DE SEVERIDAD: Suma de los cinco parámetros Leve= 0 – 5; Moderada= 6 – 9; Severa= Mayor a 10				

12.5 Anexo 5. Primers y programas:

Primers RNP:

- Forward: 5' AGATTTGGACCTGCGAGCG 3'
- Reverse: 5' GAGCGGCTGTCTCCACAAGT 3'
- Probe: 5' FAM - TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-BHQ-1 3'

Reaction Mix RNP	1X (μ L)
RNAse free H ₂ O	5
2X Mix	12.5
RNP-Forward	0.5
RNP-Reverse	0.5
RNP-Probe	0.5
ROX 1:10	0.5
Super Script III®	0.5
Volumen total de reacción	20

Parámetros en termociclador en tiempo real ABI-7500 Software v2.0.5:

- Programa:
(50°C x 5 '); (95°C x 15 '); (45 ciclos (95°C x 10"; 60°C x 40'; 72°C x 25 ")))
- Sondas:
FAM y ROX como referencia pasiva

Reaction Mix RSV/hMPV	1X (μ L)
Premix	15
RT diluida (1:10)	0.15
Muestra RNA	10
Volumen total de reacción	15.15

Parámetros en termociclador en tiempo real ABI-7500, Software v2.0.5:

- Programa:
(50°C x 5 '); (95°C x 15 '); (45 ciclos (95°C x 10"; 60°C x 40'; 72°C x 25 ")))
- Sondas:
RSV: FAM- y HMPV: VIC-
ROX as a passive dye.

12.6 Anexo 6. Escala de Landis y Koch de 1977 para índice kappa de Cohen.

Índice Kappa	Interpretación de Landis y Koch
<0.00	Pobre (<i>Poor</i>)
0.01 - 0.20	Leve (<i>Slight</i>)
0.21 - 0.40	Aceptable (<i>Fair</i>)
0.41 - 0.60	Moderada (<i>Moderate</i>)
0.61 - 0.80	Considerable (<i>Substantial</i>)
0.81 - 1.00	Casi perfecta (<i>Almost perfect</i>)

Entre paréntesis la expresión original en inglés.

12.7 Anexo 7. Muestras discordantes entre la IFA y el RT-PCR en tiempo real para HMPV

Muestra	IFA para HMPV	RT-PCR para HMPV	Valor CT
P09	-	+	20.63
P25	-	+	34.61
P91	-	+	34.68
P76	-	+	38.79
P05	+	-	Indetectable

12.8 Anexo 8. Muestras discordantes entre la IFA y el RT-PCR en tiempo real para RSV

Muestra	IFA para RSV	RT-PCR para RSV	Valor CT
P71	-	+	20.25
P17	-	+	23.44
P69	-	+	23.94
P87	-	+	24.70
P04	-	+	25.73
P78	-	+	26.04
P98	-	+	26.06
P88	-	+	26.15
P55	-	+	26.43
P44	-	+	26.85
P46	-	+	27.17
P31	-	+	27.52
P97	-	+	27.68
P64	-	+	27.79
P89	-	+	27.99
P77	-	+	28.31
P03	-	+	28.37
P90	-	+	30.08
P02	-	+	31.22
P70	-	+	31.66
P73	-	+	32.61
P83	-	+	34.24
P86	-	+	34.63
P62	-	+	35.44